

Aus dem Institut für Normale und Pathologische Physiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K. Voigt

Abteilung Immunphysiologie
Leiter: Prof. Dr. H.O. Besedovsky

Einflüsse der noradrenergen Innervation
auf die zelluläre Zusammensetzung, Zellaktivierung und
Zytokinproduktion in lymphatischen Organen während
einer spezifischen Immunantwort

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl. humanbiol. Detlev Zwingmann-Cornelius
geb. Zwingmann aus Hannover

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold
Referent: Prof. Dr. Hugo O. Besedovsky
Coreferent:

	<u>Seite</u>
Inhaltsangabe	i
Zusammenfassung	v
1. Einleitung	1
1.1 Organe des Immunsystems	1
1.2 Innervation von Milz und Lymphknoten	4
1.3 Immunstimulus: Graft versus Host Reaktion	8
1.4 Zytokine und Immunzellen	9
1.5 Immunsystem und Nervensystem	12
1.6 Arbeitshypothese und praktischer Ansatz	14
2. Material	16
2.1 Verbrauchsartikel	16
2.2 Chemikalien	16
2.3 Geräte	17
2.4 Computerprogramme	17
2.5 ELISA Kits	17
2.6 Antikörper	18
2.6.1 Antikörper für <i>in vivo</i> Stimulation	18
2.6.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie	18
2.7 Versuchstiere	19
2.7.1 Eigene Zucht	19
3. Methoden	21
3.1 Denervierungstechniken	21

	<u>Seite</u>
3.1.1 Chemische Sympathektomie bei Geburt	22
3.1.2 Chirurgische Sympathektomie der Milz	22
3.1.3 Chemische Sympathektomie des poplitealen Lymphknotens	24
3.2 Immunstimulation	26
3.2.1 LPS Stimulation	26
3.2.2 Stimulation mit anti-CD3	27
3.2.3 Systemische Graft versus Host Reaktion	27
3.2.4 Lokale Graft versus Host Reaktion	29
3.3 Messmethoden	31
3.3.1 Durchflusszytometrie	31
3.3.1.1 Lymphozytensuspension	38
3.3.2 Erythrozyten- und Leukozytenzählung	40
3.3.3 Zytokinmessung mit dem ELISA	40
3.3.4 Sonstige	43
3.3.4.1 HPLC	43
3.3.4.1 RIA	44
4. Vorbereitende Versuche	46
5. Ergebnisse	49
5.1 Denervierung	49
5.1.1 Vergleich des NA-Gehaltes in der Milz verschiedener Rattentämme	49
5.1.2 Chemische Denervierung mit 6-OH-DA bei	

	<u>Seite</u>
Geburt	51
5.1.3 Chirurgische Sympathektomie der Milz	52
5.1.4 Lokale Sympathektomie des poplitealen Lymphknotens mit 6-OH-DA	55
5.2 Systemische Graft versus Host Reaktion	61
5.2.1 Allgemeine Bestimmungen	61
5.2.2 Zelluläre Zusammensetzung in der Milz	68
5.2.3 Zytokingehalt der Milz	76
5.3 Lokale Graft versus Host Reaktion	87
5.3.1 Allgemeine Bestimmungen	87
5.3.2 Zelluläre Zusammensetzung im poplitealen Lymphknoten	90
6. Diskussion	98
6.1 Denervierung	98
6.1.1 Chemische Sympathektomie im Vergleich zur chirurgischen Durchtrennung des Milznerven	99
6.1.2 Lokale Sympathektomie des poplitealen Lymphknotens	100
6.2 Veränderungen in der Milz während systemischer Graft versus Host Reaktion	103
6.2.1 Allgemeine Bestimmungen	103
6.2.2 Zelluläre Zusammensetzung und Zytokinproduktion	107
6.2.3 Zelluläre Zusammensetzung und Zytokin-	

	<u>Seite</u>
produktion in der denervierten Milz	109
6.3 Veränderungen im poplitealen Lymphknoten während lokaler GvHR	117
6.3.1 Allgemeine Bestimmungen	117
6.3.2 Zelluläre Zusammensetzung	119
6.4 Schlussfolgerungen und Perspektiven	122
7. Literaturverzeichnis	125
8. Anhang	138
8.1 Abkürzungen	138
8.2 Lebenslauf.....	140
8.3 Akademische Lehrer	141
8.4 Publikationen	142
8.5 Ehrenwörtliche Erklärung	144
8.6 Danksagung	145

Zusammenfassung

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass neuro-endokrine Mechanismen zur physiologischen Regulation des Immunsystems beitragen. Die Vielfalt der Immunprozesse und die verschiedenen darin involvierten Zelltypen und Moleküle machen es unabdingbar, regulatorische, immun-neuro-endokrine Interaktionen während bestimmter Immunantworten zu untersuchen. Die hier beschriebenen Studien, in denen Tieren der ersten Nachkommengeneration (F1 Hybride) parentale Zellen injiziert werden, untersuchen im Besonderen die Bedeutung der Kontrolle der Immunantwort durch das sympathische Nervensystem. Diese Art der Immunantwort wird häufig als Modell für Untersuchungen der Graft vs Host (GvH) Reaktion genutzt, die z.B. nach Knochenmark-Transplantationen auftritt. Die hauptsächlichen Ziele dieser Doktorarbeit waren: 1) die Einflüsse des sympathischen Nervensystems in der Modulation der GvH Reaktion in der Milz zu untersuchen; 2) ein entsprechendes Modell zu etablieren, welches die Untersuchung dieses Problems auch im Lymphknoten ermöglicht.

Den ersten Teil der Zielsetzung fokussierend, wurden nach chirurgischer Durchtrennung des Milznerven in diesem Organ die zelluläre Zusammensetzung, verschiedene zelluläre Subtypen, Marker aktivierter lymphatischer Zellen und die Zytokinkonzentration während einer systemischen GvH Reaktion bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass a) in Kontrolltieren, bei denen davon auszugehen ist, dass sie keine Immunantwort durchlaufen, die Denervierung der Milz eine signifikante Zunahme der relativen Anteile Natürlicher Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten die den IL-2 Rezeptor exprimieren, sowie eine gestiegene Zahl CD4⁺ Zellen zur Folge hat; b) in Tieren mit einer GvH Reaktion die Denervierung der Milz zu einer signifikanten Abnahme der Zahl mononukleärer Zellen in diesem Organ führt, begleitet von einer Zunahme in der relativen Zusammensetzung Erythrozyten/Leukozyten. Obwohl die absolute Zahl der B- und T-Zellen sowie der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten vermindert ist, sind die Anteile aktivierter T-Zellen, bestimmt als IL-2 Rezeptor- oder CD134 exprimierende Zellen, deutlich erhöht. Die Zytokine IL-1 β , IL-2, TNF- α , IFN- γ und IL-10 waren in der Milz dieser Tiere deutlich erhöht. Dies ist besonders interessant, da zu diesem Zeitpunkt nach Induzierung der GvH Reaktion diese Zytokine in normal innervierten Milzen entweder im basalen Bereich (IL-1 β , IL-2), etwas erhöht (TNF- α , IL-10) oder sogar erniedrigt (IFN- γ) sind. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Denervierung der Milz eine gesteigerte immunologische Aktivität

während der GvH Reaktion hervorruft. Wenngleich die Messung des Noradrenalin-Gehaltes der Milz während der GvH Reaktion in den nicht-denervierten Milzen kein Hauptanliegen dieser Arbeit war, konnte gezeigt werden, dass in diesem Organ die NA-Konzentration während der GvH Reaktion abnimmt. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass nach Injektion parentaler Zellen das sympathische Nervensystem einen inhibitorischen Effekt auf die Immunantwort ausübt. Die physiologische Abnahme der Noradrenalin-Konzentration, die während der GvH Reaktion beobachtet wurde, könnte die Immunantwort begünstigen, indem aktivierte Immunzellen in einer Mikroumgebung zurückgehalten werden, in der sie dem immunsuppressiven Effekt des Neurotransmitters weniger stark ausgesetzt sind.

Bezüglich der Zielsetzung des zweiten Teils dieser Arbeit wurde eine minimalinvasive Technik zur lokalen und selektiven Denervierung des poplitealen Lymphknotens etabliert. Darüber hinaus konnte die Möglichkeit der Messung des Noradrenalin-Gehaltes im den Lymphknoten umgebenden Fettgewebe zur effektiven Kontrolle der Denervierung gezeigt werden. Es wurden einige Experimente durchgeführt, in denen durch die Injektion parentaler Zellen in die Fußsohle eine starke GvH Reaktion im poplitealen Lymphknoten ausgelöst wurde. Die meisten der bestimmten Parameter (Lymphknotengewicht, Zahl mononukleärer Zellen, Anteil CD4⁺ Zellen an der T-Lymphozytenpopulation und die absolute Zahl an B-, T- und CD4 Zellen, sowie an T Zellen die den IL-2 Rezeptor und CD134 exprimieren) zeigen, dass die GvH Reaktion im denervierten, poplitealen Lymphknoten vermindert zu sein scheint, vergleicht man die Ergebnisse mit dem kontralateralen, nicht-denervierten, stimulierten Lymphknoten. Die in dieser Arbeit etablierte Methode ermöglicht die Untersuchung der modulatorischen Einflüsse des sympathischen Nervensystems auf lokale Infektionen oder Entzündungen, sowie auf bestimmte Aspekte im Verlauf rheumatoider Arthritis.

Zusammengefasst geben die Ergebnisse dieser Arbeit eine weitere Bestätigung für die Hypothese, dass das sympathische Nervensystem zur Kontrolle spezifischer Immunreaktionen beiträgt.

1. Einleitung

Die Schwerpunkte immunologischer Untersuchungen der letzten Jahrzehnte konzentrierten sich auf die molekularen und zellulären Mechanismen von Immunreaktionen, der immunologischen Diversität und Eigentoleranz. Ergebnisse dieser Studien sind das Wissen um die verschiedenen Bestandteile des Immunsystems und deren funktionelle Bedeutung wie z.B. zelluläre Subtypen und ihre Mediatoren. Ebenso sind komplexere Abläufe wie die Zellaktivierung und Autoregulation innerhalb des Immunsystems weitestgehend bekannt. Im Gegensatz dazu weiß man wenig über die Interaktionen von Immunzellen und Immunzellprodukten mit anderen Körpersystemen und umgekehrt. Das ZNS z.B. kommuniziert über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse und das autonome periphere Nervensystem mit dem Immunsystem. Diese Arbeit soll den Teilaspekt der neuro-immunologischen Interaktionen untersuchen, mit dem Schwerpunkt der Einflussnahme des peripheren autonomen Nervensystems auf Immunorgane während spezifischer Immunreaktionen. Dabei sollen die systemischen Einflüsse unter physiologischen Bedingungen gewahrt bleiben.

In diesem Kapitel sind die für diese Arbeit wichtigen Grundlagen kurz dargestellt, die mit der Formulierung der dieser Untersuchung vorangestellten Arbeitshypothese abschließen.

1.1 Organe des Immunsystems

Zu den Organen des Immunsystems zählen die primären lymphatischen Organe (Knochenmark und Thymus), in denen die Bildung und Reifung lymphatischer Zellen stattfindet. Die reifen Zellen werden von diesen Organen als naive Zellen ins Blut abgegeben. Die naiven Zellen und bereits im Blut befindliche differenzierte Zellen migrieren in lymphatische und nicht lymphatische Organe

im Körper, rezirkulieren über die Blutbahn und durchwandern so die Körpergewebe mehrmals pro Tag (Westermann und Pabst, 1996 und 1998). Dies ermöglicht den naiven Zellen eine primäre Immunantwort (erstmaliger Antigenkontakt) und den differenzierten Lymphozyten eine sekundäre Immunantwort (zweiter Antigenkontakt) jederzeit im Körper auszulösen. Im folgenden werden Teile des Immunsystems wie Lymphbahnen und sekundäre lymphatische Organe (Milz und Lymphknoten) kurz beschrieben.

Lymphbahnen (Lymphatisches System}

Das lymphatische System ist ähnlich wie der Blutkreislauf ein Gefäßsystem, welches Flüssigkeit (Lymphe) aus den interstitiellen Bindegewebsräumen der Organe über Lymphkapillaren und afferente Lymphgefäße den Lymphknoten zuführt. So gelangen Antigen-Antikörper-Komplexe und lymphatische Zellen aus der Peripherie in Immunorgane um dort die aufgespürten Antigene zu präsentieren. Die Lymphe wird über efferente Lymphgefäße dem ductus thoracicus zugeführt, der die Lymphe in die linke vena subclavia entleert. Dadurch gelangen Immunzellen und Antigene, sowie in den Lymphknoten produzierte Zytokine in den Blutkreislauf und damit auch in die Milz. Zusätzlich strömen im Blut befindliche pathogene Keime und Antigene direkt über die Blutbahn in die Milz.

Lymphknoten

Lymphknoten (LK) bilden die erste organisierte lymphatische Struktur, mit der aus den Geweben kommende Antigene konfrontiert werden. Die Architektur des LK stellt eine ideale Mikroumgebung für Lymphozyten dar, um festgehaltenen Antigenen effektiv zu begegnen und adäquat zu antworten.

Ein retikuläres Netz angefüllt mit Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen durchzieht den gesamten LK, der anatomisch in drei konzentrische Regionen unterteilt ist: den Kortex, den Parakortex und die Medulla. Der außen gelegene Kortex ist reich an Lymphfollikeln und beherbergt

v.a. B-Lymphozyten, Makrophagen und folliculäre dendritische Zellen. Nach innen schließt sich der Parakortex an, der hauptsächlich von T-Zellen und aus dem Gewebe in die LK migrierenden dendritischen Zellen gebildet wird. Die dendritischen Zellen exprimieren hohe Level Klasse II Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) Moleküle auf ihrer Oberfläche, welche für die Antigenpräsentation und die Kommunikation mit T-Helfer (Th) -Lymphozyten wichtig sind. Die innerste Schicht, die Medulla, ist nur spärlich mit lymphatischen Zellen ausgestattet, von denen viele aktiv Antikörper sezernierende Plasmazellen sind.

Gelangt ein Antigen in den LK, wird dieser von interdigitierenden dendritischen Zellen festgehalten, prozessiert und gemeinsam mit Klasse II MHC Molekülen den Th-Zellen präsentiert. Die nun aktivierten Th-Zellen sezernieren Zytokine und aktivieren B-Zellen, mit denen sie kleine Herde formen. Einige der T- und B-Zellen wandern 4-7 Tage nach Antigenkontakt aus dem Parakortex in die primären Follikel im Kortex, die sich nun zu sekundären Follikeln entwickeln, in deren Keimzentren B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren. Die efferente Lymphe eines LK ist während einer Immunantwort reich an Antikörpern und hat eine fünfzigfach höhere Konzentration an Lymphozyten als die afferente Lymphe. Dieser Anstieg wird einerseits von den proliferierenden Zellen im LK verursacht, der größere Teil jedoch stammt von migrierenden Zellen, die über das Blut in die LK gelangen. Weil die antigene Stimulation die Migration aus dem Blut über das zehnfache steigert, kann die Lymphozytenzahl in einem aktivierten LK massiv zunehmen. Es wird angenommen, dass Faktoren, die während einer antigenen Stimulation im LK freigesetzt werden, für eine erleichterte Migration verantwortlich sind.

Milz

Die Milz ist ein kapsuläres Organ, das im linken, oberen Bauchraum liegt und über die Milzarterie dem Blutgefäßsystem (truncus coeliacus) angeschlossen ist. Afferente Lymphgefäße fehlen der Milz. Damit ist die Milz spezialisiert, auf

systemische Infektionen zu antworten, indem aus dem Blut kommende Antigene gefiltert und für die Antigenpräsentation festgehalten werden. Neben den Antigenen gelangen auch Immunzellen über den Blutstrom in die Milz. Untersuchungen mit markierten Lymphozyten haben gezeigt, dass die Milz täglich von mehr lymphatischen Zellen durchwandert wird als alle LK zusammen genommen (Gowans und Knight, 1964; Pabst, 1988).

Ausgehend von der Kapsel wird die Milz von bindegewebigen Strukturen (Trabekeln) durchzogen und unterteilt. Die Kompartimente bestehen aus der roten und der weißen Pulpa, die durch die Marginalzone voneinander getrennt sind. Die rote Pulpa besteht aus einem sinusoidalen Netzwerk und ist besiedelt von Erythrozyten und Makrophagen. In der roten Pulpa werden defekte und alte Erythrozyten aussortiert und von Makrophagen phagozytiert und abgebaut. Die weiße Pulpa der Milz umschließt die Äste der Milzarterie und formt die periarterioläre lymphatische Scheide (PALS). Die PALS ist hauptsächlich von T-Lymphozyten besiedelt. Die Marginalzone schließt sich peripher an die PALS an und besteht in der Hauptsache aus B-Lymphozyten, die vor allem in primären Lymphfollikeln organisiert sind.

Vom Blut kommende Antigene und Lymphozyten verlassen die Blutbahn in die Marginalzone, wo Antigene von interdigitierenden dendritischen Zellen zurückgehalten und zur PALS transportiert werden. Dort präsentieren sie die Antigene gemeinsam mit dem MHC Klasse II Molekül den B- und T-Lymphozyten, woraufhin diese aktiviert werden. Wie bei den LK wandern aktivierte B- und T-Lymphozyten zu den Follikeln, wo die B-Zellen in den Keimzentren der nun sekundären Follikel differenzieren und proliferieren.

1.2 Innervation von Milz und LK

Bereits um 1920 konnten mit Silberfärbungen Nervenfasern an den Gefäßen

der Milz nachgewiesen werden (Riegele, 1923). Seither haben diverse Gruppen gezeigt, dass diese Fasern den sympathischen Neurotransmitter Noradrenalin (NA) enthalten. In primären und sekundären lymphatischen Organen sind jedoch nicht nur die glatten Muskelzellen der Gefäßwände noradrenerg versorgt. Weitere Untersuchungen mit verbesserter Färbetechnik haben deutlich gemacht, dass neben den Blutgefäßen auch andere Strukturen in lymphatischen Organen noradrenerg innerviert sind, wie Weihe und Mitarbeiter und andere Gruppen nachweisen konnten (William et al., 1981; Felten et al. 1987; Weihe et al., 1991). Obwohl in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf Noradrenalin und noradrenergen Fasern liegt, darf die Bedeutung von freigesetzten Neuropeptiden wie dem Vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) oder Substanz P als immunoaktive Stoffe (O'Dorisio et al. 1985, McGillis et al. 1987; Fink et al., 1988; Bellinger et al., 1990; Levite, 1998) nicht außer Acht gelassen werden.

Innervation der Milz

Primäre (Knochenmark und Thymus) und sekundäre (Milz, LK, GALT) lymphatische Organe erhalten postganglionäre, unmyelinisierte, noradrenerge Fasern, die mit den Gefäßen in die Organe eintreten. In der Milz verteilen sich die Fasern mit den Bindegeweben entlang der Gefäße und Trabekel bis in das Kapselsystem. Die Innervation der glatten Muskulatur der Arterien reguliert den Blutfluss in der Milz. Abzweigend von den gefäßbegleitenden Fasern sprossen Äste in die lymphozytenreichen Gebiete aus und scheinen dabei mehr die T-Zell- als die B-Zell- assoziierten Areale zu innervieren.

Die Anfärbung der Tyrosinhydroxylase als spezifischer Marker catecholaminерger Nerven zeigt folgendes Innervationsmuster in der Milz: 1. Die rote, Erythrozyten reiche Pulpa wird bis auf einige wenige Fasern (<1%) nicht innerviert. 2. Ausgehend von den Zentralarterien verzweigen sich die noradrenergen Fasern, wobei einige in der Nähe glatter Muskelzellen bleiben, andere aber tiefer in die PALS vordringen. Diese Fasern sind sowohl nahe MHC

Klasse II abhängiger Th-Zellen, als auch MHC Klasse I abhängiger T-zytotoxischer/suppressor Zellen angelagert. 3. Zusätzlich existieren lineare Anordnungen Tyrosinhydroxylase haltiger Fasern entlang des Marginalsinus, die in engem Kontakt zu Makrophagen stehen. 4. Andere lange Nervenfasern laufen entlang der parafollikulären Zone und nur sehr selten sind Fasern in den Follikeln nachgewiesen. Aber selbst in diesen Fällen sind sie mit Ansammlungen von T-Lymphozytenpopulationen assoziiert (Felten et al., 1987). Die noradrenergen Fasern versorgen neben den T-Lymphozyten auch den Marginalsinus und die parafollikuläre Zone, die mit Antigen präsentierenden Zellen (APC) besetzt ist.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Felten & Olschowka, 1987) zeigen neben den Varikositäten (Aufreibungen der Axone, aus denen NA freigesetzt wird) auch synapsenähnliche Verbindungen noradrenerger Nervenendigungen mit Lymphozyten in der PALS. Die Endigungen der Nerven haben dabei enge Kontakte zu den Immunzellen, von denen sie nur 6nm entfernt sind. Zum Vergleich sei erwähnt, dass der synaptische Spalt zwischen Neuronen 20nm breit ist und dass der Abstand zweier Zellen an Gap Junctions 2nm beträgt. In vielen Fällen sind an den Kontaktstellen Einbuchtungen in den Lymphozyten zu sehen. Die Verbindungen zu den Immunzellen finden sowohl in tieferen Regionen der PALS als auch in der Nähe glatter Muskelzellen statt. In der Marginalzone sind sie eng an Lymphozyten und Makrophagen ähnlichen Zellen angelagert. In einer Arbeit von Saito wird postuliert, dass das Bindegewebe des retikulären Systems winzige tunnelartige Strukturen bildet, in die freigesetztes NA diffundiert und gelagert wird (Saito, 1991). Stagnierende T-Lymphozyten könnten so in diesen Räumen in direkten Kontakt zu dem Neurotransmitter treten (Elenkov et al., 2000).

Man kann also davon ausgehen, dass NA als Transmitter die Immunzellaktivität in der Milz beeinflusst. Darüber hinaus werden in der kürzlich von Elenkov et al. erschienenen Übersicht Diffusionswege des NA beschrieben,

über die das sympathische System auf parakrine Art über längere Strecken mit Immunzellen in der Milz kommuniziert (Elenkov et al., 2000). Möglicherweise liegen hierin bereits Unterschiede in der funktionellen Bedeutung, abhängig von der Entfernung, der NA Konzentration und der Expression von adrenergen Rezeptoren auf Immunzellen.

Innervation der LK

Untersuchungen cervikaler, poplitealer und mesenterialer LK in Maus und Ratte haben in diesen Organen die noradrenerge Innervation spezifischer Kompartimente aufgezeigt (Felten et al., 1987). Postganglionäre sympathische Fasern treten am Hilus in den LK ein und verteilen sich hauptsächlich in die kapsulären/ subkapsulären Bezirke und in die medulläre Region. Entlang der Gefäße in der Medulla sprießen Äste dieser Nerven in den Parakortex aus, wobei die Follikel von der nervalen Versorgung ausgespart bleiben. Einige Fasern aus der Medulla verlaufen bis zu Zellen in der äußeren kortikalen Region. Zusätzliche noradrenerge Fasern aus den kapsulären/subkapsulären Bezirken projizieren in die kortikale Region. Folgende Kompartimente der LK werden noradrenerg versorgt: die Medulla, der an T-Zellen reiche Parakortex und Kortex, parafollikuläre Gebiete im Kortex und Parakortex, der subkapsuläre Sinus und die Kapsel.

Milz und LK zeigen ähnliche Kompartimentierungen durch noradrenerge Fasern, die gleiche funktionelle Aufgaben in beiden Organen nahelegen. So sind Strukturen des Lymphozyteneintritts in die Organe wie die Marginalzone in der Milz und die kortikomedulläre Zone des LK sympathisch innerviert. Auch die Gebiete, in denen Antigene eingefangen werden (Marginalsinus in der Milz, subkapsulärer Sinus im LK) sind reichlich innerviert. Außerdem sind Gebiete der Antigenpräsentierung und der T-Zell- (PALS in der Milz, Parakortex im LK) und B-Zell Aktivierung (parafollikuläre/marginale Zone in der Milz, Kortex in dem LK) noradrenerg versorgt.

1.3 Immunstimulus: Graft versus Host Reaktion (GvHR)

In dieser Arbeit ist die Graft versus Host Reaktion als Stimulus für eine spezifische Immunantwort gewählt worden. Dabei wird eine Immunantwort induziert, bei der immunkompetente Spenderzellen (Graft) gegen die Empfängerzellen (Host) reagieren, da sie spezielle Oberflächenstrukturen, die MHC Moleküle auf den Hostzellen, als fremd erkennen und eine Abstoßungsreaktion starten (Grebe und Streilein, 1976a; Harada et al., 1994). Klinisch bedeutsam sind solche Abstoßungsreaktionen, weil sie z.B. als Begleiterscheinung bei einer Knochenmark-Transplantation vorkommen.

Als Modell für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist die semi-allogene Reaktion gewählt worden, da sie bei entsprechender Auswahl der Tierstämme die Möglichkeit bietet, Spenderzellen und Hostzellen differenziert zu betrachten. Aus zwei Inzuchtstämmen werden Nachkommen (F1-Tiere) gezüchtet, die auf ihren Zellen Oberflächenproteine exprimieren, deren genetische Information von beiden Elternteilen stammt. Injiziert man nun in das Blut dieser Tiere Immunzellen eines Elternteils, so werden von den Donorzellen (parentale Zellen) auf den Zellen der F1-Tiere nur jene Strukturen als fremd erkannt und "bekämpft", deren genetische Information vom anderen Elternteil stammen.

Die Spender T-Lymphozyten erkennen mit ihrem T-Zell Rezeptor (TCR) die MHC Moleküle auf den Zellen des Empfängertieres als Antigen, werden aktiviert und beginnen mit einer spezifischen Immunantwort bei der die Zellen proliferieren und Mediatoren des Immunsystems freisetzen. Die Mediatoren, z.B. Zytokine, aktivieren weitere Donorzellen und stimulieren zusätzlich Hostzellen, u.a. mit der Konsequenz, dass Host B-Lymphozyten Antikörper gegen den eigenen Organismus produzieren. In einer späteren Phase kommt es zu Gewebeerstörungen und Autoimmunerkrankungen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Interaktionen des Immunsystems mit dem peripheren sympathischen Nervensystem auf physiologischem Niveau zu untersuchen. Dafür sollte eine spezifische, aber schwache Stimulation des Immunsystems provoziert werden, bei der das Tier keine Krankheitszeichen wie erhöhte Körpertemperatur, Durchfall oder Hautirritationen erleidet, oder Verhaltensveränderungen sichtbar werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde nur eine niedrige Dosis Spenderzellen injiziert und ein früher Zeitpunkt für die Untersuchungen gewählt.

1.4 Zytokine und Immunzellen

In Abschnitt 1.1 sind die Immunorgane und Immunzellen beschrieben worden. Während einer antigenspezifischen Immunreaktion kommt es in diesen Organen zur Aktivierung der lymphatischen Zellen, bei der APC den Th-Zellen das an den MHC Komplex gebundene Antigen präsentieren. Im Falle der GvHR erkennen die Donor T-Lymphozyten mit ihrem TCR Teile des MHC der APC selbst als fremd (z.B. auf B-Zellen) und werden dadurch aktiviert. Die aktivierten T-Lymphozyten und andere aktivierte Immunzellen produzieren in Folge der Immunstimulation Zytokine, die in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Freisetzung unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen Zellen haben.

CD4⁺ Lymphozyten werden aufgrund ihrer Zytokinsekretion in 2 Subklassen unterteilt (Abbas et al., 1996). Die Th-1 Lymphozyten produzieren u.a. IL-2 und IFN- γ , Th-2 Lymphozyten setzen z.B. IL-4 und IL-10 frei. Die Proliferation von Th-1 oder Th-2 Zellen und das freigesetzte Zytokin werden vom Zytokingehalt und Zytokintyp in der Umgebung der Zellen bestimmt. Dieser ändert sich entsprechend des jeweiligen Zeitpunktes der Immunreaktion. So ist für die Entwicklung der Th-1 Lymphozyten IL-12 essentiell, für die Entwicklung der Th-2 Zellen muss IL-4 vorhanden sein. IL-12 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen sezerniert, wohingegen die Herkunft des für die

Stimulation der Th-2 Zellen notwendigen IL-4 nicht eindeutig geklärt ist. Man geht davon aus, dass bereits geringe Mengen IL-4 ausreichend sind, um die Th-2 Differenzierung zu starten.

In dieser Arbeit wurden IL-1 β , IL-2, IL-10, IFN- γ und TNF- α bestimmt. Diese Zytokine sind in den folgenden Absätzen kurz beschrieben. Eine schematische Übersicht über Herkunft und Wirkung von Zytokinen auf die sezernierenden Zellen ist am Ende dieses Abschnitts dargestellt.

.

Interleukin-2

IL-2 wird nach Stimulation durch APC als proinflammatorisches Zytokin in der frühen Aktivierungsphase von reifen CD4⁺ Th-1 Lymphozyten freigesetzt. Es stimuliert die sezernierende Zelle selbst und weitere CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten. Außerdem aktiviert IL-2 die Natürlichen Killerzellen (NK). CD8⁺ Zellen werden durch IL-2 in ihrer Differenzierung zu Cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) unterstützt. Darüber hinaus unterstützt dieses Zytokin die Differenzierung der B-Lymphozyten zu IgG2a produzierenden Zellen.

Interleukin-10

IL-10 ist ein Zytokin der zweiten CD4⁺ Subklasse (Th-2) und inhibiert den Th-1 Subtyp. Dabei unterstützt IL-10 die Th-2 abhängige Hemmung von Entzündungs- und Immunreaktionen, in dem es die Zytokinproduktion von Makrophagen unterdrückt und die Expression von Klasse II MHC Molekülen auf APC herunterreguliert. Indirekt hemmt so IL-10 die Aktivierung der Th-1 Zellen, da es die Produktion des für die Stimulation dieser Zellen wichtige IL-12 durch Makrophagen reduziert.

Interferon- γ

IFN- γ wird hauptsächlich von Th-1 Lymphozyten produziert, aber auch NK-Zellen scheinen IFN- γ zu sezernieren. Zu den Schlüsselfunktionen gehört die Aktivierung von Makrophagen und die Differenzierung von B-Lymphozyten zu

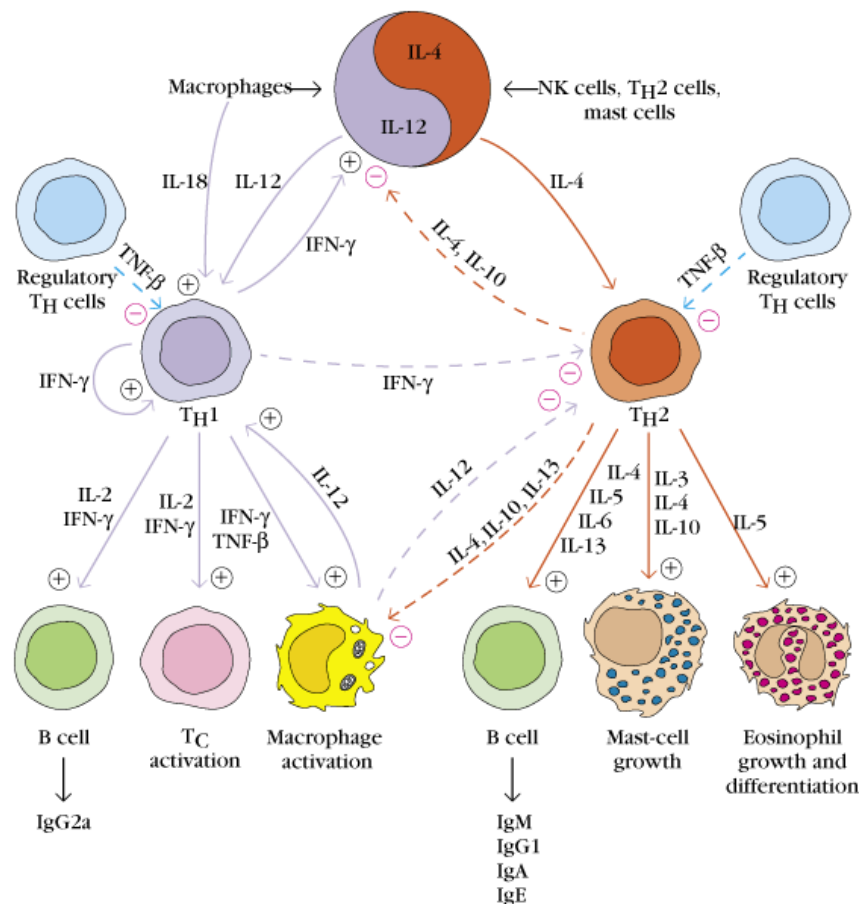


Abb.1.4.-1 Übersichtsdarstellung der Wirkung von Zytokinen der T-Helfer Lymphozyten. Die violetten Pfeile stellen die Zytokine der Th-1 Zellen, die orangenen Pfeile entsprechen den Zytokinen der Th-2 Zellen. Durchgezogener Strich bedeutet aktivierend, gestrichelte Linie bedeutet hemmender Einfluss. Entnommen aus: Kuby "Immunology" Fourth Edition

IgG2a Antikörper produzierenden Plasmazellen. Dabei wird die IL-4 induzierte IgE und IgG1 Produktion unterdrückt. Als weitere Aufgaben unterstützt IFN- γ die Differenzierung von CD8⁺ Lymphozyten zu CTL, erhöht die Zytotoxizität von NK Zellen und hemmt die Proliferation von Th-2 Zellen. Generell stimuliert IFN- γ die Expression der MHC Klasse I und II Moleküle auf vielen Zelltypen.

Tumor-Nekrose-Faktor- α

TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen und Mastzellen produziert und hat, wie der Name andeutet, einen toxischen Effekt auf Tumorzellen und Entzündungszellen. Das Zytokin induziert darüber hinaus die Zytokinfreisetzung in Entzündungszellen und ist an verschiedenen systemischen Ereignissen

während Immunreaktionen beteiligt. Dabei bewirkt TNF- α an den hypothalamischen Zentren die Fieberentstehung und scheint für den Gewichtsverlust bei chronischer Entzündung mitverantwortlich zu sein.

Interleukin-1 β

Viele Studien zu den Wirkungen und Ressourcen von IL-1 β haben die manifolde Herkunft und Funktion dieses Zytokins gezeigt. Von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und anderen Zellen sezerniert, ko-aktiviert IL-1 β CD4⁺ Zellen, unterstützt es die Reifung und Expansion von B-Lymphozyten und wirkt als Chemotaxin. Darüber hinaus erhöht IL-1 β die Aktivität der NK-Zellen und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelien. Neuere Arbeiten zeigen, dass IL-1 β die sympathische Aktivität des Milznerven beeinflusst (Rogausch et al., 1995) und dass nach LTP Induzierung von hippocampalen Zellen freigesetzt wird. Es wird angenommen, dass IL-1 β im ZNS neuromodulatorische Wirkung hat (Schneider et al., 1997).

1.5 Immunsystem und Nervensystem

Das Gehirn und das Immunsystem sind die zwei größten adaptiven Systeme im Körper. Obwohl das Immunsystem lange Zeit als eigenständig angesehen wurde, haben viele Untersuchungen der letzten 20-30 Jahre starke Hinweise gebracht, dass das ZNS Informationen vom Immunsystem erhält und umgekehrt das Immunsystem vom Gehirn moduliert wird (Besedovsky et al., 1983; Übersicht: Besedovsky und del Rey, 1996; Elenkov et al., 2000). Der Informationsaustausch erfolgt über spezielle Informationsträger, die über die Bindung an Rezeptoren das jeweils andere System beeinflussen. Auf Zellen des ZNS ist die Präsenz von Rezeptoren für IL-1 β , IL-6 oder TNF- α nachgewiesen. Funktionelle Hinweise bestehen in der Aktivierung des Vagus nach intraperitonealer Gabe von LPS (Hansen et al., 2000) und die Beeinflussung des Barorezeptorreflexes durch IL-1 β (Rogausch persönliche Mitteilung). Andere

Studien haben die Hemmung des Milzsympathikus nach Injektion von LPS und durch endogen produziertes IL-1 β gezeigt (Rogausch et al., 1995; Rogausch et al., 1997). Erste funktionelle Hinweise auf die Modulation der peripheren, sympathischen Nerven durch das Immunsystem zeigten Versuche mit Ratten, in denen nach Immunisierung mit Schaferythrozyten die Konzentration und der Umsatz von NA in der Milz reduziert ist (Besedovsky et al., 1979; Besedovsky et al., 1987; del Rey et al., 1982).

Die Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems binden generell an zwei verschiedene Rezeptorgruppen: α - und β -Adrenorezeptoren (AR). Innerhalb dieser Gruppen gibt es verschiedene Subtypen, wie z.B. α 1-, α 2-, β 1- und β 2 Rezeptoren. Ergebnisse noradrenerger Effekte auf das Immunsystem sind z.T. gegensätzlich, wenngleich die unterschiedlichen Versuchsbedingungen berücksichtigt werden müssen. Zum einen haben Rezeptorstudien β -adrenerge Bindungsstellen auf den meisten Immunzellen zeigen können, wobei die Dichte der Rezeptoren auf den verschiedenen Zellen unterschiedlich ist (Übersicht Sanders et al., 2001; Madden, 2001). In Untersuchungen ruhender und aktivierter Th-Subtypen konnten auf den Th-1, nicht aber auf den Th-2 Lymphozyten β 2Adreno-rezeptoren (β 2AR) nachgewiesen werden (Ramer-Quinn et al., 1997; Sanders et al., 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zahl und die Affinität der Rezeptoren von der Art des Immunstimulus und dem jeweiligen Aktivierungszustand der Zelle abhängt. B-Lymphozyten z.B. exprimieren nach zweifacher allogener Immunisierung weniger β -adrenerge Rezeptoren auf der Zellmembran, während gleichzeitig ihre Affinität erhöht wird. Im Gegensatz dazu werden in diesen Versuchen auf T-Lymphozyten keine Änderungen der Rezeptoraktivität und -dichte beobachtet (Genaro und Borda, 1989). Andere Untersuchungen haben nach Stimulation mit IL-2 in ruhenden zytotoxischen T-Lymphozyten eine gesteigerte β -adrenerge Rezeptoraktivität messen können (Dailey et al., 1988).

Funktionelle Hinweise auf die Beeinflussung des Immunsystems durch das

Nervensystem sind in vivo und in vitro durchgeführt worden. Die Zerstörung des peripheren sympathischen Nervensystems oder chirurgische Milznervdurchtrennung erhöht die Immunantwort auf antigene Stimuli (Besedovsky et al., 1979). Diese Ergebnisse stimmen mit Versuchen überein, in denen β 2-adrenerge Stimulation eine mitogen oder anti-CD3 induzierte Proliferation von Zellen vermindert. Auch die Produktion von IL-2 und IFN- γ in aktivierten T-Lymphozyten ist nach β 2-adrenerger Stimulation reduziert. Ein weiteres Indiz für die funktionellen Zusammenhänge der Innervation mit dem Immunsystem ist die verstärkte Migration von aktivierten Lymphozyten aus der Milz (Ernström & Sandberg, 1973) und den LK (Moore, 1984) nach Infusion von Catecholaminen. Der Ausstrom von Lymphozyten aus der Milz ist vermutlich über β -adrenerge Rezeptoren beeinflusst, da die Migration der Zellen nach spezifischer Blockade der β -Rezeptoren bei gleichzeitiger Gabe von Noradrenalin niedriger ist als es entsprechend des Flusswiderstandes in der Milz zu erwarten wäre (Rogausch et al., 1999). Modifikationen der Immunantwort in der Milz und ein verändertes Migrationsverhalten der Lymphozyten unter dem Einfluss von NA basieren vermutlich auf den in Kapitel 1.2 beschriebenen Kontakten zwischen immunkompetenten Zellen und peripheren Nervenfasern.

1.5 Arbeitshypothese und praktischer Ansatz

Nach dem heutigen Wissensstand besteht kein Zweifel, dass das sympathische Nervensystem eine Immunantwort beeinflussen kann. Jedoch sind die Interaktionen zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem von der Art der Immunstimulation und den untersuchten Organen abhängig. Darüber hinaus hat der Zeitpunkt der Untersuchungen während einer Immunreaktion und die Art der Manipulation des Nervensystems bedeutenden Einfluss auf die Ergebnisse.

Der Nachweis von β -adrenergen Rezeptoren auf Immunzellen und die Tatsache, dass eine Immunantwort die NA-Konzentration und den NA-Umsatz in der Milz verändert, führt zu der Frage, welche Mechanismen der zellulären Antwort während einer spezifischen, Antigen induzierten Immunisierung durch das Fehlen der sympathischen Innervation lymphatischer Organe verändert werden. Mit dieser Fragestellung soll folgende Arbeitshypothese untersucht werden: ein erniedrigter NA-Spiegel moduliert die Immunantwort auf einen allogenen Stimulus, in dem einerseits die Zahl nukleärer Zellen in lymphatischen Organen verändert wird, und hierbei im besonderen Maße aktivierte Zellen betroffen sind, und dass zweitens der Aktivierungszustand der Lymphozyten von dem NA-Gehalt in der Milz abhängt.

Um diese Hypothese zu überprüfen wird mit der systemischen Graft versus Host Reaktion an Ratten mit chirurgischer Sympathektomie der Milz der Einfluss noradrenerger Innervation auf die zelluläre Zusammensetzung der Milz während einer spezifischen Immunantwort untersucht. Die durchflusszytometrischen Bestimmungen sind dabei in besonderem Maße auf die Beeinflussung aktivierter Lymphozyten fokussiert. Die Messungen der Zytokine in der Milz untersuchen die noradrenergen Einflüsse auf die Zytokinproduktion der verschiedenen Zelltypen in der Milz.

In einem zweiten Versuchsabschnitt werden vergleichende Messungen nach einer peripher induzierten GvHR am lokal denervierten poplitealen durchgeführt. Die Entwicklung einer neuen Technik zur minimalinvasiven Denervierung des LK steht dabei im Vordergrund.

2 Material

2.1 Verbrauchsartikel

<u>Artikel</u>	<u>Firma</u>
Bottle top Filter CA 0,2 µm	Nalgene, Wiesbaden
chirurgisches Nähmaterial für Tiere	
Polyesterfaden, Stärke 3, 100m	Vömel, Kronberg
Seidenfaden, 0,7 100m	Braun-Dexan, Spangenberg
Combitips 1,25-12,5 ml	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Röhrchen	Saarstedt, Nümbrecht
Einmal Insulinspritze 1 ml	BD, Heidelberg
Einmalspritzen steril, 1/5/10/30 ml	Braun, Melsungen
Falconröhrchen 5-50ml	BD, Heidelberg
Hamiltonspritze 10µl	Hamilton Bonaduz AG, CH
Kanülen (0.4x20, 0.55x25)	BD, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Superior, Marienfeld
Nylonnetze 100µm	Basel, CH
Pasteurpipetten, Glas	WU, Mainz
Petrischalen, 60x15	Nalgene Wiesbaden
Pipettenspitzen	Abimed, Langenfeld
Polystyrenröhrchen 5 ml (FACS-Röhrchen)	Greiner, Frickenhausen
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Spritzenfilter, steril, CA, 0,2 µm	Millipore, Bedford, USA
sterile Saugstreifen, Zellulose	Kettenbach Medizin, Eschenburg

2.2 Chemikalien

<u>Artikel</u>	<u>Firma</u>
6-OH-DA (2,4,5-Trihydroxyphenethylamine)	Sigma, Deisenhofen
ACT (Amonchlorid, Tris-Puffer)	Merk, Darmstadt
Ascorbinsäure	Merk, Darmstadt
Ethanol 96%	Merk, Darmstadt
FACS-Puffer	T.J. Baker, Deventer, NL
FCS (Foetales-Kälber-Serum)	Biochrom, Berlin
Hayem-Lösung	Merk, Darmstadt
Ketavet (Ketaminhydrochlorid, 100mg/ml)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
LPS (Lipopolysaccharid)	Difco, Detroit, USA
NaAzid	Merk, Darmstadt
PBS Dulbecco's (w/o Ca ⁺⁺ +Mg ⁺⁺)	GibcoBRL, Karlsruhe
Rinderalbumin (BSA Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Rompun 2%	Bayer AG, Leverkusen
RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamine	GibcoBRL, Karlsruhe
Trypan Blau Lösung 0,4%	Sigma, Deisenhofen

Türks Lösung

Merk, Darmstadt

2.3 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Firma</u>
Durchflußzytometer FACScan	BD, Heidelberg
Computereinheit für Durchflußzytometer	Hewlett Packard, USA
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Kühlzentrifuge, Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen
Metallsiebe	Feinmech.Werkstatt, Inst. f. Physiologie Uni Marburg
Multipette (Distriman)	Gilson, Abimed Tuttlingen
Pipettboy	I n t e g r a B i o s c i e n c e s , Fernwald
Pipetten, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Abimed, Tuttlingen
Plattenlesegerät (ELISA-Reader)	SLT, Crailsheim
Polytron, 7mm	Kinematica AG, Littau, CH
Reagenzglasschüttler (Minishaker)	Ika Labortechnik, Staufen i.Breisgau
Sterilbank	Nuare, Plymouth, USA
Wasserbad, schüttelbar	GFL, Burgwedel

2.4 Computerprogramme

<u>Programm</u>	<u>Firma</u>
EasyFit	SLT, Crailsheim
FlowMate 3.1	Dako
PC Lysis und Lysis II	Becton Dickinson
Canvas 3.5	Deneba
StatView 5.0	SAS
WordPerfect 3.5	Corel

2.5 ELISA-Kits

Die kommerziellen Ratten ELISA-Kits sind für die Messung von Antikörpern in Zellkulturüberständen und Serum hergestellt. Für den speziellen Nachweis im Plasma und in Gewebehomogenisaten wurden verschiedene ELISA unterschiedlicher Firmen ausgetestet. Die unten aufgeführten Kits eignen sich entsprechend den angesetzten Kriterien für Plasmaproben, sowie für Überstände aus Milz- und Lymphknoten- Homogenisaten (3.3.2). Folgende Assays sind verwendet worden:

<u>Kit</u>	<u>Firma</u>
Interleukin-1 β	Endogen
Interleukin-2	R&D Systems
Interleukin-10	R&D Systems
Tumor-Nekrose-Faktor- α	R&D Systems
Interferon-gamma	Endogen

2.6 Antikörper

2.6.1 Antikörper für *in vivo* Stimulation

Antigen	Spezies/Klon	Bezugsquelle	Eingesetzte Konz.
Ratte CD3	Maus IgG3/ G 4.18	PharMingen Heidelberg	90 μ g/Tier

2.6.2 Antikörper für die Durchflußzytometrie

Für die durchflußzytometrischen Analysen wurden direkt markierte monoklonale Primärantikörper eingesetzt. Alle Antikörper wurden von der Firma PharMingen in Heidelberg bezogen.

Antigen	Spezies/ Klon	Farbstoff	Phänotyp	Eingesetzte Konz.
Ratte CD4	Maus IgG _{2a} / OX-38	FITC	CD4	0,1 μ g/1x10 ⁶ Zellen
Ratte CD8a	Maus IgG ₁ / 341	FITC	CD8 alpha Kette	0,5 μ g/1x10 ⁶ Zellen
Ratte B-Lymphozyten	Maus IgG ₁ / OX-33	FITC	CD45RA	0,5 μ g/1x10 ⁶ Zellen
Ratte T-Lymphozyten	Maus IgG ₁ / OX-19	R-PE	CD5	0,5 μ g/1x10 ⁶ Zellen
R a t t e N a t ü r l i c h e Killerzellen	Maus IgG ₁ / 10/78	FITC	NKR-P1A	0,5 μ g/1x10 ⁶ Zellen
Ratte Makrophagen	Maus IgG _{2a} / His36	R-PE	ED-3	1 μ g/1x10 ⁶ Zellen
Ratte IL-2 rezeptor	Maus IgG ₁ / OX-39	FITC	CD25 alpha Kette	1 μ g/1x10 ⁶ Zellen

Antigen	Spezies/ Klon	Farbstoff	Phänotyp	Eingesetzte Konz.
Ratte CD134	Maus IgG _{2b} / OX-40	FITC	aktivierte T- Lymphozyten	1µg/1x10 ⁶ Zellen
Isotyp	Maus IgG _{2a}	FITC	Maus IgG _{2a} Isotypenkontrolle	1µg/10x ⁶ Zellen

2.7 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden einerseits kommerziell erworben und stammen andererseits aus der hauseigenen Züchtung. Alle Versuchstiere sind im adulten Alter in den Experimenten verwendet worden. Die Ratten sind jeweils eine Woche vor Versuchsbeginn in Einzelkäfigen gehalten und hatten freien Futter- und Trinkwasserzugang. In den Tierställen sind die Tiere einer konstanten Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 55-60% und einen 12 /12 Stunden Hell - Dunkel Zyklus ausgesetzt. Tierhaltung und Experimente wurden entsprechend den geltenden Vorschriften der Ethik-Kommission durchgeführt.

Für die Versuche mit systemischer Denervierung und für die allogenen Stimulationsversuche mussten die Ratten in den hauseigenen Tierställen gezüchtet werden. Die Zuchttiere, sowie alle weiteren Ratten die in den Experimenten eingesetzt wurden, sind bei der Firma Harlan Winkelmann in Borsten gekauft worden. Diese Tiere werden von der Firma regelmäßig auf Viren, Bakterien und Parasiten untersucht und gelten bei Lieferung als Infektionsfrei.

2.7.1 Eigene Zucht

Für die Host versus Graft und Graft versus Host Versuche wurden Tiere der 1. Nachkommen-Generation in den hauseigenen Tierställen gezüchtet. Als parentale Elterntiere werden 12-14 Wochen alte, weibliche Wistar Kyoto Ratten (WKY) mit männlichen, 12-14 Wochen alten PVG Tieren verpaart. Sind die Weibchen tragend werden sie von den Männchen separiert. Ca. 4 Wochen postkonzeptionell gebären die Weibchen durchschnittlich zwischen 10 und 14 Jungtiere. Diese verbleiben die ersten 4 Wochen postnatal zur Aufzucht mit dem Muttertier in einem Käfig. Danach werden gleichgeschlechtliche Geschwistertiere in einem Käfig weiter aufgezogen, bis sie für die Versuche in Einzelhaltung genommen werden. Die Tiere sind einer regelmäßigen Gewichtskontrolle unterzogen. Auf gleiche Weise wurden für die Versuche mit chemischer Denervierung WKY-Tiere aus parental WKY Ratten gezüchtet und großgezogen. In der Tabelle 2.7 sind die Tiere, die in den verschiedenen

Versuchsreihen verwendet wurden aufgeführt.

Tabelle 2.7 Auflistung der verschiedenen Tierstämme für die unterschiedlichen Experimente

Experiment	Stamm	Sex	Alter	Gewicht	Herkunft
systemische Denervierung LPS	WKY/NHsd	männlich und weiblich	9-12 Wochen	männlich: 260-340g weiblich: 190-220g	Harlan-Winkelmann Borsten
systemische Denervierung anti CD3	WKY/NHsd	männlich	28-32 Wochen	männlich: 340-450g	Harlan-Winkelmann Borsten
Host versus Graft	WKY/NHsd (WKY x PVG)F1	weiblich	28-32 Wochen	weiblich: 200-250g	Harlan-Winkelmann Borsten; eigene Zucht
chirurgische Denervierung der Milz LPS	WKY/NHsd	männlich	9-12 Wochen	männlich: 150-290g	Harlan-Winkelmann Borsten
systemische Graft versus Host Reaktion	PVG/OlaHsd (WKY x PVG)F1	männlich	10-13 Wochen	männlich: 230-330g	Harlan-Winkelmann Borsten; eigene Zucht
lokale Graft versus Host Reaktion	PVG/OlaHsd (WKY x PVG)F1	weiblich	10-13 Wochen	weiblich: 150-220g	Harlan-Winkelmann Borsten; eigene Zucht

3. Methoden

3.1 Denervierungstechniken

Die Arbeit untersucht die Bedeutung der Innervation lymphatischer Organe für Immunreaktionen. Im folgenden werden die verschiedenen Techniken zur Denervierung vorgestellt, die im Laufe der experimentellen Arbeit verwendet wurden.

Bei den ersten Versuchen sind die peripheren vegetativen Nerven bereits bei Geburt mit 6-OH-DA zerstört worden. Diese Art der Denervierung bleibt im Gegensatz zur systemischen Lyse des Sympathikus im adulten Alter lebenslang erhalten. Diese systemische Zerstörung hat den Nachteil, dass alle inneren Organe von der peripheren sympathischen Innervation getrennt werden. Die Aussagefähigkeit der Ergebnisse wird erschwert und eine Interpretation der Ergebnisse kann nicht ausschließlich auf die Wirkung der verminderten Innervation lymphatischer Organe reduziert werden. Aus diesem Grund wurde in den Folgeexperimenten der Milznerv chirurgisch durchtrennt, um so die Ergebnisse in Bezug auf die Milz konkretisieren zu können und lokale Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen peripherem Nervensystem und Immunsystem zu untersuchen.

In einem optimalen Modell zur Untersuchung der wechselseitigen Einflussnahme ist neben der lokalen Denervierung auch die Immunreaktion regional begrenzt. Die Milz ist als Immunorgan im zentralen Gefäßsystem gelegen und somit in die systemische Immunreaktionen eingebunden, an der auch LK beteiligt sind. Diese könnten denervierungsbedingte Änderungen der Milz kompensieren. Eine lokal begrenzte Immunantwort kann durch antigene Stimulation des poplitealen LK (pLK) hervorgerufen werden. Ein Teilziel dieser Arbeit war es, die noradrenerge Innervation dieses Organs minimalinvasiv zu reduzieren, um die wechselseitigen Einflüsse der Innervation lymphatischer Organe auf eine lokal begrenzte

Immunantwort (allogene Reaktion) zu untersuchen. Diese Technik zur Denervierung des pLK wurde neu entwickelt und ist als letzte Technik in diesem Kapitel beschrieben.

3.1.1 Chemische Sympathektomie bei Geburt

Neugeborenen Ratten werden in den ersten 5 Tagen postnatal täglich 150 mg/kg Körpergewicht 6-OH-DA intraperitoneal injiziert. Nach Tranzer und Thoenen (Thoenen und Tranzer, 1968) führt diese Behandlung zur selektiven und permanenten Zerstörung der peripheren, noradrenergen Nervenendigungen. Die Verdünnung des 6-OH-DA erfolgt in einer NaCl (0,9%) - Ascorbinsäure (0,01%) Lösung, um die sofortige Oxidation des 6-OH-DA zu verhindern. Die parallel mitgeführten Kontrolltiere erhalten das gleiche Volumen der Verdünnungslösung ohne dem Sympathicolitikum ip appliziert. In Kapitel 5.1 sind die gemessenen Noradrenalinwerte in den denervierten Tieren gezeigt.

3.1.2 Chirurgische Sympathektomie der Milz

Tiere

Männliche, 150-250g schwere WKY (LPS Versuche) oder F1- Ratten (GvH) werden 1 Woche vor der Operation in Einzelhaltung gebracht. 24 Stunden vor dem Eingriff wird der Futterzugang entzogen, das Trinkwasser bleibt frei zugänglich.

Anästhesie

100mg/kg Körpergewicht Ketamin (100mg/ml) + 2mg/kg Körpergewicht Xylazin (20mg/ml) ip injiziert.

Vorbereitung

Für die Operation stehen folgende Utensilien bereit:

Binocular und Kaltlichtpunktleuchte, steriles Präparationsbesteck, sterile

physiologische Kochsalzlösung, Nähutensilien und Tupfer (aus der Augenchirurgie). Mit einer Haarschneidemaschine werden Bauch und Brust der Tiere enthaart und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Für die Konstanthaltung der Körpertemperatur liegen die Tiere auf einer 37°C warmen Platte.

Operation

Mit einer Hautschere wird durch mediane Laparatomie entlang der linea alba der Bauchraum eröffnet. Mit je einem Stich werden beidseitig des Schnittes je 2 Fäden festgemacht, unter deren Zug (nach Fixierung am OP-Tisch) das Operationsgebiet eröffnet wird. Mit einer feinen Schere durchtrennt man das Häutchen zwischen großer Magenkurvatur und Milz. Mit drei Tupfern können nun die Milz, der Magen und die Leber, sowie das Intestinum gegeneinander verschoben und fixiert werden, so dass der Gefäß-Nervenstrang der Milz klar dargestellt ist. Der Milznerv wird vor der Teilung in rechten und linken Milzast durchtrennt. Mit der Spitze eines zugeschnittenen Tupfers befreit man vor dieser Auftrennung durch leichtes Schaben die lienalen Blutgefäße von dem umliegenden Fett des "Omentum Majus", in das die Gefäße eingebettet sind. Der Strang ist jetzt nur noch von einer milchig aussehenden Bindegewebsscheide umgeben, die ebenfalls durch vorsichtigen Einsatz der kleinen Tupfer abgerieben werden kann. An dieser Stelle muss vor allem an den Venen sehr behutsam gearbeitet werden, da man diese durch mechanische Beanspruchung leicht beschädigt und Rupturen hervorruft. Nachdem der Bindegewebsmantel abgetragen ist, sind Arterie und Vene gut voneinander zu lösen. Der Nervus lienalis ist zu diesem Zeitpunkt als zusammengefasster, weißlicher Nervenstrang auf den Gefäßoberflächen zu erkennen. Man muss nun mit Hilfe einer feinen Pinzette und der Spitze eines Tupfers den Nerv lösen, um ihn mit einer feinen Gewebeschere über eine Länge von ca. 5mm herauszuschneiden.

Nachdem der Nerv durchtrennt worden ist, entnimmt man die im Bauchraum befindlichen Tupfer und ersetzt den Flüssigkeitsverlust mit ein paar Tropfen

steriler, physiologischer Kochsalzlösung in die Bauchhöhle. Mit Seidengarn der Stärke 0,7 werden Peritoneum und Muskulatur im fortlaufendem Stich zusammengenäht. Die Haut wird mit Polyesterfaden der Stärke 3 mit ausstülpender U-Einzelnaht verschlossen. Unter einer Heizlampe stehen die Tiere bis zum Erwachen unter Beobachtung, bevor sie in den Tierstall zurückgebracht werden. Die Tiere haben sofort freien Futter- und Wasserzugang. Innerhalb von 7 Tagen postoperativ erholen sich die Tiere vom Operationsstress und können danach im Experiment eingesetzt werden.

3.1.3 Chemische Sympathektomie des poplitealen Lymphknotens

Durch die hier beschriebene, neu entwickelte Technik zur Reduzierung des Noradrenalins im pLK, kann unter Ausschluss der systemischen Einflüsse, eine lokale Immunreaktion unter denervierten Bedingungen untersucht werden.

Tiere

Weibliche (WKYxPVG) F1. Alle Tiere werden eine Woche vor der OP in Einzelkäfigen gehalten, sind 12-14 Wochen alt und wiegen zwischen 160 und 200g.

Anästhesie

100mg/kg Körpergewicht Ketamin (100mg/ml) + 2mg/kg Körpergewicht Xylazin (20mg/ml) ip injiziert.

Dosis

Die Tiere erhalten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 10 Minuten je zwei Injektionen mit 6-OH-DA in die Kniekehle. Dabei werden pro Injektion 50µg 6-OH-DA in einem Volumen von 10µl Ascorbinsäure appliziert. Pro denerviertem pLK werden so an zwei Tagen insgesamt 200µg 6-OH-DA injiziert. In die kontralaterale Kniekehle wird nach dem gleichen Schema zur Kontrolle nur Ascorbinsäure gespritzt.

Durchführung

Mit einem Haarschneidegerät wird der Unterschenkel über die Kniekehle hinweg bis zum Oberschenkel enthaart. Bei genauer Betrachtung des Hinterlaufes sind die Randstrukturen der Musculi gastrocnemius, flexor digitorum superficialis und semitendinosus erkennbar. Am Schneidepunkt der Muskeln unterhalb der Kniekehle entsteht ein Winkel, der als Orientierungspunkt für den Einstich der Injektionsnadel dient. Die Ratte liegt ventralwärts auf dem Operatiostisch. Der Einstich der Nadel durch die Lederhaut am gestreckt gehaltenem Bein erfolgt an dem von den Muskeln gebildeten Winkel, wobei die Nadel parallel zum Unterschenkel (M. gastrocnemicus) cranialwärts ca. 5mm weit in die Kniekehle vorgeschoben wird. Eine Markierung an der Nadel verhindert ein zu tiefes Einstechen in die Cavität der Kniekehle und Verletzungen des Kniegelekes werden vermieden. Die Nadelspitze befindet sich nun im Fettgewebe, in das der pLK eingebettet ist. Mit Hilfe einer Markierung an der Hamiltonspritze kann die Nadelöffnung dem der Unterseite der Haut anliegendem LK zugewendet werden. Wird die Spritze nun am Unterschenkel aufgelegt, befindet sich die Nadelöffnung mit großer Wahrscheinlichkeit in der Nähe des pLK. Bei der Injektion gelangt so das 6-OH-DA treffgenau an das lymphatische Organ. Um eine optimale Denervierung des LK zu gewährleisten, wird bei den folgenden Injektionen die Nadel während des Einspritzvorgangs langsam um 360° gedreht. Die Flüssigkeit wird dadurch gleichmäßig im umliegenden Gewebe verteilt und würde auch dann an den LK gelangen, wenn die Nadel beim Einstechen zwischen LK und Hautinnenseite positioniert worden wäre oder seitlich davon läge.

Der Erfolg dieser Denervierungstechnik ist durch die Messung des NA im LK mit der HPLC-Technik nachgewiesen. Bei den Versuchen zur Zellzusammensetzung werden die LK für die flowzytometrischen Untersuchungen verwendet. Deshalb kann der NA-Gehalt im gleichen LK nicht gemessen werden. Alternativ wird zur Überprüfung des Denervierungserfolges das NA im umliegenden Fettgewebe

gemessen, welches auch nach der Denervierung mit dem Gehalt des Neurotransmitters im LK korreliert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sich das Fett als Kontrollgewebe für den NA-Gehalt im LK sehr gut eignet. Bei der Organentnahme wird deswegen zusätzlich das umliegende Fettgewebe entnommen.

Die Vorteile dieser Denervierungstechnik im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren (Lorton et al., 1996) liegt auf der Hand. Durch den nicht-invasiven Eingriff ist das Risiko von Entzündungen und Infektionen durch die Behandlung so niedrig wie bei systemischer Denervierung mit 6-OH-DA. Drei Tage nach der letzten Injektion in die Kniekehle sind die Kortikosteronwerte im Blut der Tiere im Normalwertbereich, so dass die Ratten für immunologische Stimulationen zur Verfügung stehen.

3.2 Immunstimulation

3.2.1 LPS Stimulation

LPS, eine Komponente der Zellwand gram-negativer Bakterien, ist bekannt als polyclonaler Aktivator von B-Zellen. Aber auch Antigenpresentierende Zellen wie z.B. Makrophagen werden stimuliert und sezernieren Zytokine. Die Versuche in dieser Arbeit mit LPS wurden an Tieren durchgeführt, deren noradrenergen peripheren Fasern bei Geburt mit 6-OH-DA zerstört wurden. In den LPS Experimenten sollte untersucht werden, ob NA die Immunreaktion beeinflusst und ob die Art der Denervierung unterschiedlichen Einfluss auf die Immunantwort nach LPS Stimulation hat. In allen Experimenten wurde LPS der gleichen Charge und identischer Potenz intraperitoneal injiziert. Die Tiere bekamen 10µg/kg Körpergewicht LPS verabreicht und die Organentnahme erfolgte 2 bzw. 24 Stunden nach der Injektion.

3.2.2 Stimulation mit anti-CD3

Nach der Bindung monoklonaler Antikörper an den CD3 T-Zell Komplex werden die T-Zellen polyklonal aktiviert. Für die Untersuchungen der Einflüsse noradrenerger Innervation lymphatischer Organe auf Lymphozyten, wurde ein monoklonaler Maus anti-Ratte CD3 Antikörper intraperitoneal injiziert. In diesen Versuchen wurden die Tiere bei Geburt mit 6-OH-DA denerviert, oder mit Ascorbinsäure behandelt. Die Tiere bekamen anti-CD3 (90µg/Tier) intraperitoneal gespritzt und die Milz wurde 3 Stunden nach der Applikation für die Untersuchungen entnommen.

3.2.3 Systemische Graft versus Host Reaktion

Tiere

10-12 Wochen alte (WKYxPVG) F1 Versuchstiere werden lokal denerviert und eine Woche vor Experimentbeginn zum Streßabbau in Einzelkäfigen gehalten.

Zellsuspension

Die Milzzellsuspension für die Injektion in die F1 Hybriden werden aus den Milzen von männlichen PVG Ratten (allogene Reaktion) bzw. männlichen (WKYxPVG) F1 Tieren (syngene Reaktion) gewonnen. Die Herstellung der Suspension wird unter sterilen Bedingungen unter dem Abzug durchgeführt. Nach der Entnahme der Spendermilzen werden diese in steriles, 4°C kalte RPMI + 5% FCS (Medium) überführt und unter sterilen Bedingungen mit den geschliffenen Seiten zweier Objektträger vorsichtig zerdrückt. Zum Homogenisieren wird die Suspension mit einer Pasteurpipette mehrmals im Medium aufgezogen. Nach Sedimentation schwerer Organreste wird die Suspension in 50ml Falconröhrchen überführt und anschließend mit 300 x g bei 4°C für 10min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in steriler, hypertoner ACT-Lsg resuspendiert, auf 15ml aufgefüllt und bei 37°C in einem Wasserbad 3min inkubiert. Anschließend wird die ACT-Lsg durch

Zugabe von 20ml RPMI neutralisiert und sofort zentrifugiert. Die lysierten Erythrozyten befinden sich danach im Überstand und werden verworfen. Das Sediment wird mit RPMI+5% FCS resuspendiert, gewaschen und zentrifugiert. Alle Zellpellets (für 3 Injektionen werden zwei Rattenmilzen benötigt) der Milzen eines Tierstammes werden in einem 15ml Falconröhrchen gepoolt, mit 10ml sterilem PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Die Zellen werden in 3 ml PBS aufgenommen und in der Neubauerkammer gezählt. Die Konzentration der Lymphozytensuspension wird auf 1×10^8 Lymphozyten pro ml PBS eingestellt.

Zellinjektion

8 Tage nach der operativen Milznervdurchtrennung bzw. der Scheinoperation werden in die (WKYxPVG) F1 Tiere 1×10^8 Lymphozyten intravenös injiziert. Die Kontrolltiere erhalten Lymphozyten von F1, die GvHR wird durch Inokulation männlicher PVG Zellen hervorgerufen. Für die Injektion werden die Versuchstiere mit einem Aether-Luft Gemisch narkotisiert. Auf dem Rücken liegend wird der Penis hervordrückt und mit Zeigefinger und Daumen fixiert. Nachdem der Penis mit 70%igem Ethanol desinfiziert worden ist, wird die Nadel der Injektionsspritze durch die Penishaut vorsichtig in die sichtbare Penisvene eingestochen. Unter Beobachtung des Penis wird nun 1ml der Zellsuspension langsam iv injiziert. Dabei schwillt der Penis kurzzeitig an. Geht die Schwellung nicht innerhalb kurzer Zeit nach Beendigung des Einspritzvorgangs zurück, ist die Injektion vermutlich subcutan erfolgt. Zur Kontrolle des gelungenen Einstiches wird daher der Injektionsvorgang kurzzeitig unterbrochen, um sicher zu gehen, dass das Inoculat über die Vene abgeführt wird und keine Schwellung bestehen bleibt. Nach Injektionsende wird die Einstichstelle bis zur Blutstillung mit einem Tupfer abgedrückt.

Zeitverlauf der GvHR und Organentnahme

Die Tiere werden unter regelmäßiger Messung des Körpergewichtes weiterhin in Einzelkäfigen gehalten, bevor 10 Tage postinjektional die Organe zur Untersuchung entnommen werden. Die Decapitierung erfolgt mit Hilfe einer

Guillotine. Die benötigte Zeit von der Entnahme der Tiere aus dem Käfig bis zur Blutentnahme beträgt nicht mehr als 30 Sekunden. Das aus den Halsgefäßen austretende Blut wird in 10ml EDTA-Röhrchen aufgefangen. Durch Bildung von Kalziumkomplexen wird die Gerinnung des Blutes verhindert. Jeweils nach drei Tieren werden die Blutröhrchen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 2400 x g für 15min abzentrifugiert, das Plasma aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

Nach der Blutentnahme wird mit einer Hautschere der Situs durch einen horizontalen Schnitt in Höhe der Milz eröffnet. Unter zur Hilfenahme einer stumpfen Pinzette wird die Milz angehoben. Mit einer feinen Organschere werden die Blutgefäße direkt am Milzhilus durchtrennt. Die entnommene Milz wird gewogen und in 3 Teile zerteilt. Das runde (ehemals caudale) Ende wird als ca. 100mg schweres Stück in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung des Noradrenalins bei -20°C gelagert.

Das anschließende Stück (ca.100-150mg) wird abgetrennt, gewogen und für die Herstellung der Zellsuspension in 1ml kalter Arbeitslösung (AL) (PBS-BSA 0,1%-NaAzid 0,02%) aufbewahrt. Das verbleibende Milzendstück (spitzes Ende) wird ebenfalls in Flüssigstickstoff eingefroren und für die Zytokinbestimmung bei -20°C bis zur Aufbereitung gelagert.

3.2.4 Lokale Graft versus Host Reaktion

Bei der lokalen GvHR wird eine regional induzierte Immunreaktion am pLK hervorgerufen (Ford et al., 1970). Dazu werden dem weiblichen (WKYxPVG) F1 Tier 1×10^7 Lymphknotenzellen subcutan in die Fußsohle injiziert. Die Zellen für die syngene Stimulation werden aus LK von weiblichen (WKYxPVG) F1-Ratten gewonnen. Für die allogenen Versuche stammen die Zellen von weiblichen PVG Ratten.

Zellgewinnung

Dem Spendertier werden die sublingualen-, axillären-, inguinalen-, lumbalen- und thorakalen LK entnommen. Alle LK werden in sterilem, 4°C kaltem PBS gesammelt und nach Beenden der Organentnahme mit den geschliffenen Seiten zweier steriler Objektträger über einer Petrischale zerdrückt. Durch mehrmaliges Aufziehen der Zellen in PBS werden diese homogenisiert. Nach Sedimentation der schweren Organtrümmer wird die Zellsuspension in ein 10ml Falconröhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Nach der anschließenden Zentrifugation wird das Pellet mit PBS resuspendiert. Die Suspensionen eines Stamms werden gepoolt und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden in 2ml PBS resuspendiert, in der Neubauerkammer gezählt und die Zellzahl auf 1×10^7 Lymphozyten pro 0,1ml PBS eingestellt.

Zellinjektion in die Fußsohle

3 Tage nach Denervierung des pLK werden 100µl der Lymphozytensuspension subcutan in die Fußsohle injiziert. Den Kontrolltieren werden F1 Lymphozyten injiziert, die allogene Reaktion wird durch Inokulation von PVG Zellen hervorgerufen. Für die Injektion werden die Versuchstiere mit einem Aether-Luft Gemisch narkotisiert. Ventralwärts liegen die Ratten auf dem Behandlungstisch. Nachdem die Fußunterseiten mit 70%igem Ethanol desinfiziert worden sind, wird die Nadel der Injektionsspritze durch die Oberhaut der Fußsohle eingestochen und zur Fußspitze vorgeschoben. Nachdem die Injektion erfolgt ist, wird die Einstichstelle mit einem Tupfer abgedrückt bis keine Flüssigkeit mehr austritt. 5 Tage nach Inokulation der Zellen werden die Tiere für die Organentnahme getötet.

Organentnahme

Die Ratten werden am Versuchstag durch die Guillotine getötet und das Blut in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Nach Zentrifugation wird das Plasma aliquotiert und eingefroren (s.o.). Mit drei Fixiernadeln wird das Bein des auf dem Rücken liegenden Tieres auf der Styroporunterlage befestigt und der pLK

entnommen. Dafür wird die Haut von der Wade bis zum Oberschenkel aufgetrennt. Die Haut an der Kniekehle wird abgespannt. Dadurch wird das Kniekehlenfett sichtbar und mit einer gebogenen Pinzette wird der im Fett liegende LK freipräpariert, ohne den Fettbolus zu zerstören. Der vom Fett befreite LK wird herausgenommen, gewogen und in kalter RPMI+FCS 5% bis zur Aufbereitung für die Facsanalyse gelagert. Auf gleiche Weise wird der kontralaterale pLK entnommen. Für die Noradrenalinmessung wird das den LK umgebene Fett entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

3.3. Messmethoden

3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Lymphozytensubpopulationen wurden mittels der Flowcytometrie Technik mit dem Durchflußzytometer "FACScan" der Firma Becton Dickinson bestimmt. Dieses Gerät erlaubt die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen. Granularität, die Größe und drei verschiedene Fluoreszenzfarben können für mehr als zehntausend Zellen in weniger als einer Minute ermittelt werden. So lassen sich neben der Größe und Granularität u.a. Nukleinsäuregehalt, Enzymaktivitäten, Kalziumströme, das Membranpotential, intrazelluläre Proteine u.a. bestimmen.

Die Komponenten des FlowCytometers bestehen aus einer Lichtquelle (Laserlampe); einem Flüssigkeitssystem, um den Flüssigkeitsstrom durch den focussierten Lichtstrahl zu führen und zu regulieren; einer Optik, welche den Lichtstrahl focussiert und ausrichtet; Filtern, die nur Licht bestimmter Wellenlängen erzeugen; elektronischen Detektoren zur Messung der Lichtintensität des Signals und zur Aufzeichnung der Impulse; einem Computersystem zur Analyse und Speicherung der Lichtsignale und zur

Auswertung der Messdaten.

Probenzuführung

Grundvoraussetzung zur Messung mit einem Durchflußzytometer ist das Vorliegen der Probe als Einzelzellsuspension in einer Konzentration von 0,2-1 Millionen Zellen/500 µl. Es sind Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 µm unterscheidbar. Vor der Messung werden die Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Die Herstellung der Lymphozytensuspensionen aus Milz und LK ist in 3.3.1.1 beschrieben. Zur Analyse wird die in einem Polystyrenröhrchen vorliegende Zellsuspension mit Überdruck durch eine Stahlkapillare in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Zellen aneinandergereiht sequentiell den Analysenpunkt erreichen. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Der Analysenpunkt ist die wichtigste Stelle im gesamten System. Es ist der Ort, an dem der Lichtstrahl (Laser) die Zellen im Bruchteil einer Sekunde erfasst, analysiert und klassifiziert.

Messung der Lichtstreuung

Die Lichtstreuung wird als ein physikalischer Prozess definiert bei dem ein Partikel (eine Zelle) mit dem einfallenden Lichtstrahl interagiert. Dabei wird nur die Richtung, nicht die Wellenlänge (Farbe) des anregenden Lichts verändert. Folgende Zelleigenschaften beeinflussen die Lichtstreuung:

- Zellgröße
- Struktur der Zellmembran
- intrazelluläre Bestandteile

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut: der größte Anteil wird entlang des einfallenden Lichtstrahls gestreut. Dieses Licht wird als Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter, FSC) bezeichnet und ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße (kleine Zellen streuen weniger Licht).

Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt

hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab. Die Bezeichnung lautet Seitwärtsstreulicht (engl. side light scatter, SSC). Granulozyten mit ihren irregulären Zellkernen z.B. haben ein intensiveres SSC Signal als die einheitlicheren Lymphozyten oder Erythrozyten.

Messung der Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz wird das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes verstanden. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen weiten, für sie charakteristischen Wellenlängenbereich. Mit dieser "absorbierten" Energie werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung der Elektronen auf das Grundniveau werden Lichtteilchen (Photonen) emittiert. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Der Lichtbereich, über den eine fluoreszierende Verbindung angeregt werden kann, ist dessen Absorptionsspektrum.

In der analytischen Durchflußzytometrie wird ein Argon-Ionenlaser verwendet, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm generiert. Bei der Verwendung dieses Lasers sind alle Farbstoffe geeignet die von 488 nm angeregt werden können. Die Absorptionsmaxima sollten bei diesem Wert liegen. Wird ein Farbstoff außerhalb seines Absorptionsmaximums- aber noch innerhalb seines Absorptionsspektrums - angeregt, so äußert sich das in einer Verminderung der Fluoreszenzintensität, nicht aber in einer Änderung der Fluoreszenzfarbe. Die emittierten Farben werden jeweils in eigenen Kanälen dargestellt. In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe:

- Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) (Kanal FL1)
- Phycoerythrin (PE) (Kanal FL2)

verwendet, die bei gleichzeitiger Färbung einer Zelle eine Zweifarben-Immunfluoreszenzmessung erlauben. Diese Mehrfarbenfluoreszenzanalyse ermöglicht die Korrelation mehrerer Zelleigenschaften, so z.B. Zelltyp und Aktivierungszustand. Neben der gemeinsamen Anregbarkeit muss die Bedingung erfüllt sein, dass sich die Gipfel der einzelnen Emissionsmaxima zur

Messung mit verschiedenen Detektoren deutlich voneinander unterschieden.

Optische Einrichtung (Abb. 3.3-1)

Der Lichtstrahl der Argon-Laserlampe wird mit einer vorgelagerten Linse auf die Mitte des Flüssigkeitsstroms gebündelt ausgerichtet. Der Strahl beleuchtet die Flüssigkeit gleichmäßig beim Durchtritt durch das Medium, dem "observation point". Um diesen Punkt herum befinden sich Linsen, die das durchtretende Lichtsignal sammeln. Zur Trennung der Wellenlängen setzt man optische Filtration ein, um unabhängige Messungen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zu erhalten. Diese Filtration wird durch den Einsatz von dichroitischen Spiegeln und Emissionsfiltern erreicht. Dichroitische Spiegel teilen das Licht bei einer festgelegten Wellenlänge (Kante). Wenn es sich um einen Spiegel mit Kurzpasseigenschaften handelt, wird das Licht mit einer Wellenlänge die größer ist als die Kante des Spiegels reflektiert. Licht kleinerer Wellenlänge wird durchgelassen. Bei Spiegeln mit Langpasseigenschaften ist dies umgekehrt.

Das abgelenkte Licht wird auf Photodetektoren (Sekundärelektronenvervielfacher, SEV Röhren) focussiert, welche das Lichtsignal in elektrische Impulse umwandeln. Die Intensität des Impulses ist proportional zur Intensität des auftreffenden Lichtsignals. Jedem Detektor ist ein Emissionsfilter vorgelagert, der die spektrale Reinheit erhöht. Der Detektor im Kanal FL1 erzeugt ein Signal, wenn grünes Licht der Wellenlänge 530nm vom Flüssigkeitsstrom auf ihn abgelenkt wird und eine zur FITC - Messung optimale Bandbreite von 30nm hat. Der Kanal FL2 misst Wellenlängen von 585nm (rot), die zur Feststellung von Phycoerythrin (PE) mit einer Bandbreite von 44nm optimiert ist. Spektrale Überlappungen entstehen durch den gemeinsamen Emissionsbereich der Fluoreszenzfarbstoffe. Die trotz Emissionsfilter entstehende Überlappung kann durch die Elektronik reduziert werden. Die elektronische Kompensation subtrahiert bei richtiger Einstellung die überlappenden Signale.

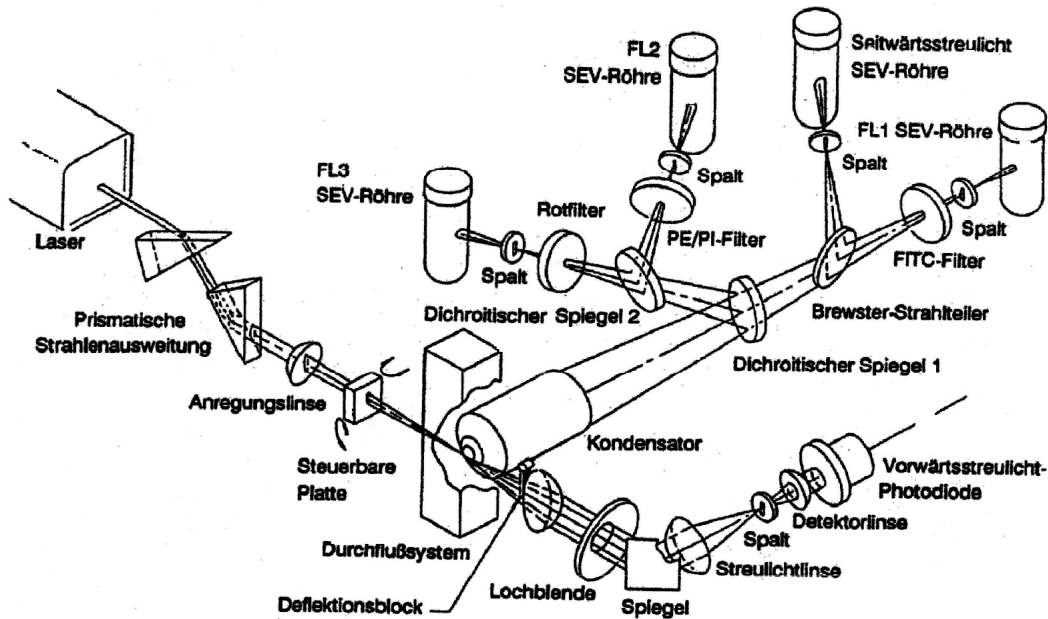


Abb. 3.3.-1 Optisches System des Flowzytometers "FACScan" (Becton & Dickinson)
Im Durchflußsystem trifft das Laserlicht auf die Zellsuspension und erzeugt das Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und die drei emittierten Farben, die auf den Kanälen FL1-3 aufgezeichnet werden. (Erklärung siehe Text)

Zwei weitere Detektoren sind mit einem Filter ausgestattet, der Licht gleicher Farbe wie das der Lichtquelle selbst durchlässt. Sie registrieren die Seitwärtsstreuung und die Vorwärtsstreuung des Argon-Laser Lichtes.

Datenverarbeitung und Auswertung

Nach Messung der Lichtsignale werden die elektrischen Impulse über einen Analog-Digital-Wandler der Computereinheit zugeleitet. Die Daten werden mit der FACScan Research Software aufgezeichnet und verarbeitet. Jeder Datenpunkt enthält die Messwerte der verschiedenen Detektoren. Mit der Auswertesoftware (Flowmate, Fa. Dako) werden die Werte des Vorwärtsstreulichtes (FSC) und des Seitwärtsstreulichtes (SSC) linear, die Fluoreszenzwerte (FL1 und FL2) logarithmisch dargestellt. Die 10.000 gemessenen Zellen einer Probe können als Dotplot (Punkte) oder als Histogramm (Häufigkeitsverteilung) ausgewertet werden. Durch die Markierung bestimmter Populationen in den Diagrammen, berechnet das Programm deren prozentualen Anteile an der Gesamtpopulation. Die Abbildungen 3.3.-2+3

zeigen Beispiele für die beiden Diagrammtypen. Im Ergebnisteil sind die prozentualen Anteile der Subpopulationen in Säulendiagrammen dargestellt.

Gating und Bestimmung der Subpopulationen

Schon während der Messung (live gate) oder während der späteren Auswertung können gezählte Impulse ausgeschlossen werden. Beim live gate werden nur die im Gate befindlichen Impulse gemessen, d.h. die außerhalb des Gates befindlichen Impulse werden nicht registriert. Beim Gating während der Auswertung werden nur die im Gate befindlichen Messwerte in die Berechnung einbezogen. Auch die Kombination beider Gates ist möglich. Für die Milzzellsuspensionen ist ein life gate, welches evtl. vorhandene Erythrozyten nicht mitzählt, verwendet worden. In der Auswertung wird dann ein genaueres

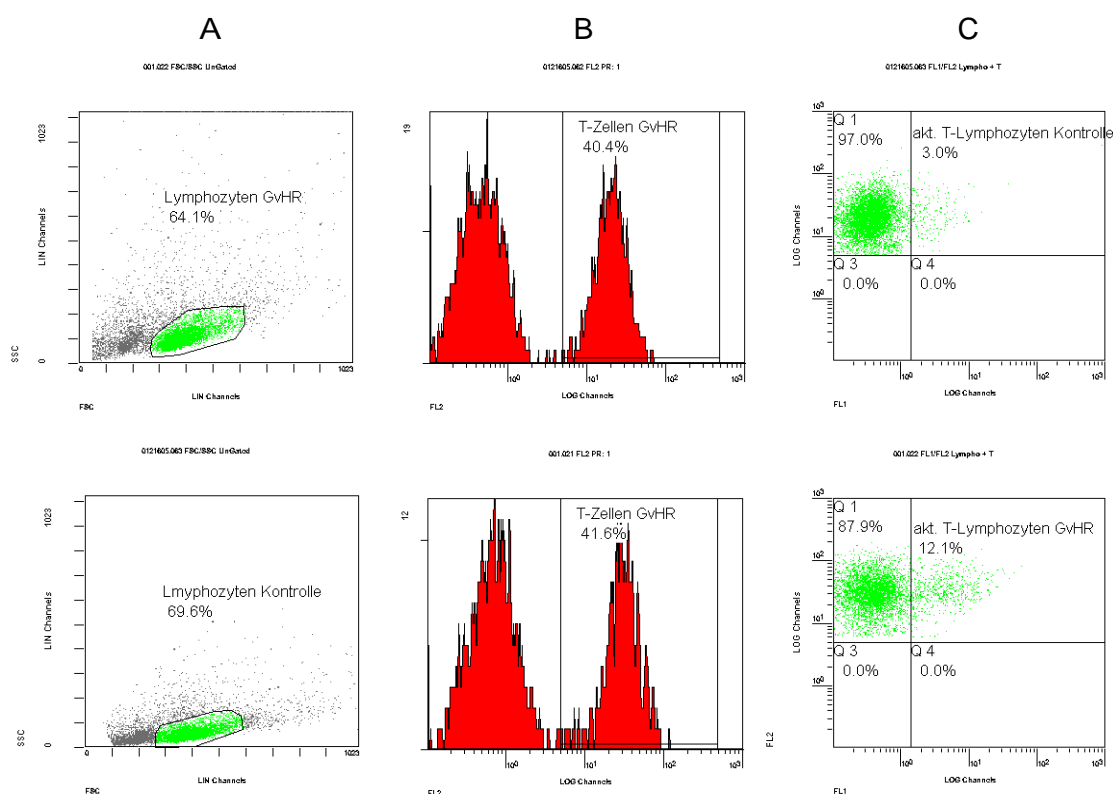
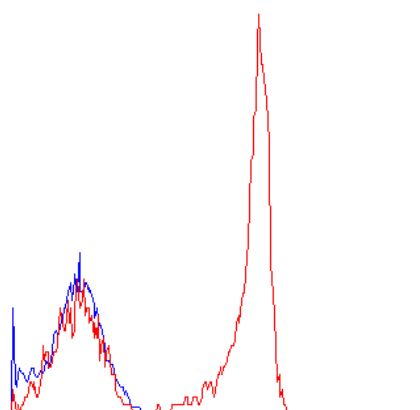


Abb.3.3-2 Beispiel des "Gating" von Lymphozyten. A: "dot plot" einer Lymphozytensuspension im FSC und SSC Kanal. Die grünen Punkte sind die für die Auswertung ausgewählte (gated) Lymphozytenpopulation. B: Im Kanal FL2 (PE) sind CD5⁺ Zellen (T-Lymphozyten, rechter Peak) der Population aus A dargestellt. C: In dieser Grafik sind alle CD5⁺ Zellen aus B als Punkte im FL1/ FL2 dot plot aufgetragen. Im rechten oberen Quadranten befinden sich doppelt markierte CD5⁺/CD134⁺ Zellen. Die Prozentzahl entspricht dem Anteil der aktivierten T-Lymphozyten an der gesamten T-Zell Population. Obere Reihe: Suspension einer Kontrollmilz; Untere Reihe: Milzzellen während einer GvHR.

Gategesetz, in dem sich die Lymphozyten befinden, aus denen die Subpopulationen bestimmt werden (Abb. 3.3.3-A). Aus den Zellen dieser Eingrenzung werden die prozentualen Anteile der fluoreszenzmarkierten Zellen in den FL1 und FL2 Kanälen bestimmt. Die Abbildung 3.3.-2B zeigt das Histogramm einer im FL2 (PE) dargestellten T-Lymphozytenpopulation. Die Zellen, die sich sowohl im Lymphozytengate (Abb. 3.3-2A) und im T-Zellgate (Abb.3.3-2B) befinden sind in der Abbildung 3.3.-2C dargestellt. Die Lymphozyten sind mit anti-CD5 (FL2) und anti-CD134 (FL1), ein Marker für aktivierte T-Zellen (akt.T⁺), Antikörpern inkubiert. Die doppelt gefärbten Zellen (CD5⁺/CD134⁺) entsprechen dem Anteil aktivierter T-Zellen an der T-Lymphozyten Population. Auf diese Weise sind alle T-Lymphozyten-Subpopulationen (CD4⁺, CD8⁺ und CD25⁺) bestimmt worden. Mit Einzelmarkierungen werden die Anteile der B- und T-Zellen, sowie der NK Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt.

Isotypenkontrolle zum Nachweis unspezifischer Bindungen

Die Antikörper, mit denen die Oberflächenepitope auf den Lymphozyten bestimmt werden, sind monoklonale Maus anti-Ratte Antikörper. Diese sollten spezifisch CD Epitope der jeweiligen Zellen binden. Um sicher zu stellen, dass der Antikörper die Lymphozyten nicht unspezifisch bindet, werden mit dem selben Farbstoff (FITC) markierte, unspezifische Maus Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse mit den Milzlymphocyten der Ratte inkubiert. Kommt es zu einer Bindung auf den Zellen, würde dies im Histogramm des entsprechenden Kanals mit einem Peak zu



sehen sein. In Abbildung 3.3-3 ist ein Überlagerungshistogramm gezeigt, in dem die rote Kurve die Bindung von spezifischen Maus anti-Ratte CD4 zeigt.

Abb.3.3-3 Overlay Histogramm einer Zellfärbung mit Maus IgG2a Isotypenkontrolle und einer weiteren Zellfärbung mit einem Maus IgG2a anti-Ratte CD4 (FITC) Antikörper. Erläuterung siehe Text

Die rote Kurve ist von einer blauen Kurve überlagert, welches der Messung einer Milzsuspension entspricht, die mit unspezifischen Maus Immunglobulinen der gleichen Klasse (IgG2a) inkubiert worden ist. Deutlich ist der Peak der anti-CD4 Antikörper zu sehen, die an Lymphozyten gebunden sind. Das blaue Histogramm zeigt lediglich den Kurvenverlauf der Hintergrundfärbung, die durch die Eigenfluoreszenz der Zellen zu stande kommt. Der Peak der Eigenfluoreszenz ist auch im roten Histogramm zu sehen. Die verwendeten IgG2a Antikörper der Maus zeigen demnach keine unspezifische Färbung in Milzzellsuspensionen. Von bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführten Isotypenkontrollen ist bekannt, dass die in dieser Arbeit verwendeten IgG1 und IgG2b Immunglobuline der Maus keine unspezifische Bindungen an Rattenlymphozyten hervorrufen.

3.3.1.1 Lymphozytensuspension

Von der frisch entnommenen Milz wird ein etwa 100-150mg schweres, mittleres Stück herausgeschnitten und in 1ml 4°C kalte Arbeitslösung (AL), bestehend aus PBS-BSA 0,1%-NaAzid 0,02% (s.u.), überführt. Das Gewebe wird dann unter sanftem Druck mit dem gummierten Kolbenende einer 5ml Kunstspritze durch ein Metallsieb gedrückt. Sieb und Kolbenende werden mit 1ml AL abgespült. Von dieser 2ml Primärsuspension werden 100µl für die Erythrozyten- und Leukozytenzählung entnommen (3.3.2). Anschließend wird die Suspension durch ein Nylonnetz mit 100µm Porengröße gefiltert, um die homogene Zellsuspension von Bindegewebsresten zu trennen. Um eine möglichst reine Lymphozytensuspension zu erhalten, müssen die Erythrozyten lysiert werden. Dazu werden die Zellen in 10ml hypotoner Salzlösung (ACT-Lsg. s.u.) bei 37°C für 3min unter Schwenken im Wasserbad inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation mit 300 x g bei 4°C für 10min werden die Zellen zweimal in Arbeitslösung gewaschen und das Pellet in einem definierten Volumen Arbeitslösung resuspendiert (Milzzellen in 2ml, Lymphknotenzellen in 1ml).

In der Neubauer Zählkammer wird die Zahl nukleärer Zellen bestimmt. Die Gesamtzellzahl wird durch anfärben der kernhaltigen Zellen mit Türkslösung ermittelt. Die toten Zellen werden mit Trypanblau angefärbt und gezählt. Die Zahl lebender Zellen errechnet man durch Subtraktion der toten Zellanteile von der Gesamtzellzahl. Für die Weiterbehandlung wird die Lymphozytensuspension auf 1×10^6 Zellen pro 450 μ l eingestellt (entspricht $2,2 \times 10^6$ pro ml). Entsprechend der Anzahl benötigter Proben wird das Gesamtvolumen angesetzt.

Zur Phenotypisierung werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, monoklonalen Antikörpern, inkubiert. Die Antikörper werden in einem Volumen von 50 μ l der geeigneten Konzentration des jeweiligen Antikörpers (wie zuvor in Titrationsversuchen ausgetestet) zu der Zellsuspension (450 μ l) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 4°C im Dunklen für 30min. Nach zwei abschließenden Waschgängen in je 4ml FACS-Puffer und der Aufnahme der Zellen in 500 μ l FACS-Puffer kann die Probe gemessen werden.

Für die Erstellung von Lymphknotensuspensionen gelten folgende Änderungen:

1. Der gesamte LK wird verwendet
2. Eine Lyse der Erythrozyten findet nicht statt. Die Zellen werden ohne Filtrieren zwei mal gewaschen und in 1ml aufgenommen.
3. Die eingesetzte Zellzahl beträgt 2×10^5 Zellen/450 μ l

ACT-Lösung: 9 Teile Lösung 1 (0,16 M NH_4Cl) +
 1 Teil Lösung 2 (0,17 M Tris, pH 7,65)

Arbeitslösung: PBS-BSA 0,1%-NaAzid 0,02%
 495 ml PBS (Dulbeccos)
 500 mg Rinderalbumin Fraktion V
 5 ml 2%ige Natriumazid Lsg

FACS-Lsg: PBS
 1% FCS
 0,01% Natriumazid

3.3.2 Erythrozyten- und Leukozytenzählung:

Für die Bestimmung der Erythrozyten- und Leukozytenzahl in der Gesamtmilz werden die Zellen aus den Primärsuspensionen gezählt. Die Leukozytenzahl wird mit der Türkslösung ermittelt (s.o.). Die Erythrozyten werden in Heyem Lösung gezählt. Dazu wird 10µl der Primärsuspension mit 990µl der Heyem Lösung vermischt (Verdünnung 100fach) und in der Neubauerkammer gezählt.

Berechnung: $\text{Erythrozyten/mm}^2 \times 100 = \text{Zellen} \times 10^4/\text{ml}$. Multipliziert mit zwei (Primärlösung in 2ml) = Zellzahl/Gewebestück. Da das Gewicht des Milzstückes nach Organentnahme gewogen wurde, kann die Gesamtzellzahl/Milz bzw. Gesamtzellzahl/g Milz berechnet werden. Für die Berechnung der Leukozyten muss die 10fache Verdünnung (Türks) und das Volumen der Primärlösung beachtet werden.

3.3.3 Zytokinmessung mit dem ELISA

Die Messung der Zytokine in den sekundären lymphatischen Organen und dem Plasma der untersuchten Tiere ist mit der ELISA-Technik durchgeführt worden. Da die kommerziell angebotenen Assays nur für die Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen und Serum bzw. Plasma angeboten werden, musste die Brauchbarkeit der Kits für Überstände aus Organhomogenisaten ausgetestet werden (s. Problematik).

Probenvorbereitung

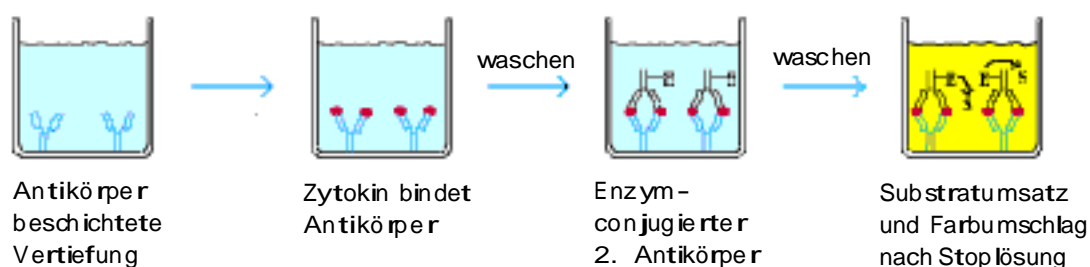
Die nach der Organentnahme gewogenen und auf Trockeneis tiefgefrorenen

Gewebe werden zur Aufbereitung in PBS (1ml/400mg) aufgetaut und dann mit einem Gewebehomogenisator (Fa. Kinematica AG) ca. 20 Sekunden lang zerkleinert. Die Gewebestücke zur Verarbeitung wiegen max. 300mg. Anschließend werden die Homogenisate bei 20.000 x g und 4°C für 10min zentrifugiert, in 125µl Portionen aliquotiert und bei -70°C bis zur Zytokinbestimmung gelagert. Um die proteolytischen Zersetzung der Gewebe zu verhindern, wird die Aufarbeitung stets unter Kühlung in Eiswasser durchgeführt.

Prinzip des Assays (Abb.3.3.-4)

Dieses Nachweisverfahren verwendet die quantitative Sandwich Enzym Immunoassay Technik. Die Vertiefungen von 96-Loch Microtiterplatten sind mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern gegen das jeweils zu untersuchende Zytokin der Ratte vorbeschichtet (pre-coated). Standards, Kontrollen und die Proben werden in die Vertiefungen pipettiert. Jedes freie Zytokin, für welches das Kit spezifisch ist, wird von den immobilisierten Antikörpern gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen durch mehrere Waschzyklen entfernt worden sind, wird ein Streptavidin-HRP gebundener, polyklonaler Antikörper, ebenfalls spezifisch gegen das gebundene Zytokin, hinzu gegeben. Dieser 2. Antikörper bindet ein anderes Epitop am Zytokin. Dieses ist jetzt wie in einem Sandwich eingeschlossen. Nachdem das ungebundene Antikörper-Enzym Reagenz in dem anschließenden Waschschrift abgespült worden ist, wird eine Substratlösung (TMB) in die Vertiefung gegeben. In einer enzymatischen Reaktion wird das Substrat umgesetzt. Die dabei entstehende blaue Farbe wechselt zu gelb, wenn durch Veränderung des pH-Wertes die Enzyme inaktiviert werden und die

Abb. 3.3.-4 Sandwich ELISA



Reaktion gestopt wird. Innerhalb von 30 Minuten nach Beenden der Farbreaktion wird die optische Dichte, d.h. die Intensität der Farblösung in den Vertiefungen gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zu der Menge gebundenen Zytokins. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt über die Messung der Absorption von monochromatischem Licht beim Durchtritt durch die Farblösung. Entsprechend der Absorption der Standardlösung bekannter Konzentration kann der Gehalt in den Gewebe- und Plasmaproben bestimmt werden. Die Konzentration der Proben wird automatisch am Computer berechnet. Die Konzentrationen Zytokin/Organ bzw. Zytokin/g Gewebe wird unter Berücksichtigung der Vorverdünnung während der Homogenisierung des Gewebes ermittelt. Liegen Werte oberhalb der maximalen Standardkonzentration, muss man die Proben zusätzlich vorverdünnen. Der Verdünnungsfaktor ist ebenfalls in den Berechnungen zu berücksichtigen.

Problematik

Keine der verfügbaren ELISA Kits sind für die Messung der Zytokine in Gewebeüberständen bestimmt. Da die Antikörperkombinationen der verschiedenen Firmen unterschiedliche Eigenschaften besitzen, mussten für die Messungen der verschiedenen Zytokine in der Milz das optimale Kit ermittelt werden. Dazu wurde die Recovery des Protein und die zu erwartende Konzentration verschiedener kommerzieller Kits bestimmt:

1. Recovery: Hierbei zeigt sich, wieviel von dem in den Proben befindlichen Zytokin tatsächlich gemessen wird. Gibt es unspezifische Bindungen der precoateten Antikörper mit anderen Substanzen als dem zu messenden Zytokin, kann das die Messung beeinflussen, es entstehen sogenannte Interferenzen. Für die Bestimmung der Recovery wird zu gleichen Teilen Standard definierter Konzentration mit dem Überstand des Gewebehomogenisats einer Kontrollmilz vermischt und gemessen. Der gemessene Wert entspricht dem aufgedeckten Anteil (Recovery) der tatsächlich vorhandenen Zytokinmenge. 100% Recovery erhält man, wenn der

gemessene Wert die Summe aus der Konzentration der Standardprobe und der Kontrollmilz ergibt.

Wenn die Recovery bei verschiedenen getesteten Standardkonzentrationen gleich bleibt, sind die Bedingungen bestmöglich, d.h. die Recovery bleibt auch bei unterschiedlichen Zytokinmengen gleich. Eine Recovery von 75-125% wurde für die Messungen des Zytokins in der Milz akzeptiert.

2. Bestimmung des zu erwartenden Konzentrationsbereiches: Die Zytokinkonzentration in der Milz mit der GvHR war nicht bekannt und kann ggf. für die Kits der verschiedenen Firmen unterschiedlich sein. Deswegen wurden Homogenisate von Testorganen in absteigender Verdünnung auf ihren Zytokingehalt überprüft. Dadurch kann die Verdünnung ermittelt werden, bei der die Zytokinkonzentration im optimalen Standardkurvenbereich liegt. Zudem wird sichtbar, ob eine Verdünnung der Proben Einfluß auf die Zytokinkonzentration hat. Bestenfalls verringert sich die Konzentration linear mit der Verdünnung. Die für die Proben gewählte Verdünnung liegt in einem Bereich, in dem mindestens drei aufeinanderfolgende Konzentrationen den Verdünnungsschritten entsprechen.

3.3.4 Sonstige: HPLC und RIA

Da diese Messungen routinemässig in den Labors durchgeführt werden, sind diese Techniken hier nur kurz beschrieben.

3.3.4.1 HPLC (Hochleistungs Flüssigchromatographie)

Die HPLC ist eine Sonderform der Säulenchromatographie. Unter Druck fließt das Elutionsmittel mit der Probe durch die mit der stationären Phase gefüllten Trennsäule. Die Trennleistung der Säule hängt stark von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase ab. Je kleiner und gleichmäßiger die Teilchen geformt sind, desto größer ist die Trennleistung.

Nachdem die in der Probe befindlichen Teile entsprechend ihrer Größe getrennt sind, werden sie beim Durchtritt durch den elektrochemischen Detektor gemessen. Dabei wird das Noradrenalin oxidiert und amperometrisch detektiert.

Durchführung

Die Gewebeproben werden in 0,4 M Perchlorsäure homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Die Alliquots des Überstandes werden in ein HPLC-System mit elektrochemischer Detektion injiziert und bestimmt. Die Höhe der gemessenen Ausschläge wird quantifiziert und die Konzentration mit Hilfe eines mitgeführten Standards bestimmt. Alternativ kann die Konzentration durch Integration der Fläche des Ausschlages mit einer Auswertesoftware (Millennium Session Manager, Millipor Corp.) berechnet werden.

3.3.4.2 RIA (Radio-Immuno-Assay)

Bei dem kompetitiven RIA konkurrieren das zu messende Kortikosteron (Ag) in der Probe mit einem in definierter Menge zugegebenen, radioaktiv markierten Kortikosteron (Ag^x) um die Bindung an einem ebenfalls in definierter Menge hinzugefügten Antikörper (Ak). Da die Antikörpermenge 50% der Menge des markierten Kortikosterons nicht übersteigt, stellt sich ein biochemisches Gleichgewicht ein: $Ag + Ag^x + \text{Antikörper} = [Ag-Ak] + [Ag^x-Ak]$.

Ag und Ag^x haben schließlich im gleichen Verhältnis zueinander den Ak gebunden, wie es für die noch freien Ag- und Ag^x - Anteile gilt. Wird nun nach Reaktionsende das ungebundene, radioaktiv markierte Kortikosteron an einen Träger gebunden, sedimentiert es während der Zentrifugation. Die Radioaktivität des Überstandes wird als % der Gesamtaktivität des Testansatzes (Gesamt- Ag^x) und unter Bezug auf eine Eichkurve ausgewertet. Bei diesem klassischen, kompetitiven RIA bedeutet viel Radioaktivität im Komplex wenig Ag in der Probe und umgekehrt.

Durchführung

1. Vorbereitung: Ansetzen der Gebrauchslösung und Probenverdünnung
Puffer; Kohlelösung; Standard Kortikosteron; Tracer (Tritium markiertes Kortikosteron); Antikörperserum; Probenverdünnung 1 : 250
2. Als Kontrollen wird mit jedem Lauf eine positiv Kontrolle mitgeführt
3. Puffer und Standard/Proben werden pipettiert und 20min bei 98°C inkubiert.
An Transcortin (Trägerprotein im Blut) gebundenes Kortikosteron wird losgelöst
4. Hinzufügen definierter Mengen markierten Kortikosterons und Antikörper
5. Inkubation für 18-24 Stunden bei 4°C
6. Zugabe von Kohlelösung für 20min
7. Zentrifugation
8. Überstand in Szintillationslösung geben und im β -Counter jede Probe 2min messen

4. Vorbereitende Experimente

In den vorbereitenden Experimenten wurden die Techniken für die optimalen Versuchsbedingungen entwickelt. Aufgrund des Umfangs dieser Arbeit und um die Übersichtlichkeit zu gewähren, wurde auf die Darstellung der Ergebnisse aus den Vorversuchen verzichtet. Dennoch soll in diesem Kapitel kurz die Entwicklung des immunologischen Modells, der optimalen Denervierungstechnik, der Titrierung für die Durchflusszytomtrie verwendeten Antikörper und die Optimierung der ELISA-Kits für die Zytokinmessung in der Milz aufgezeigt werden.

Für die geplanten Untersuchungen wurde ein möglichst effizientes, immunologisches Modell benötigt, welches eine messbare Stimulation des Immunsystems bewirkt ohne sichtbare Krankheitszeichen hervorzurufen. Dazu wurde in ersten Versuchen das Immunsystem der Tiere mit niedrigen Dosen LPS (10µg/kg Körpergewicht) und unterschiedlicher Applikationsdauer stimuliert. In diesen Versuchen wurden neben der Titrierung der Antikörper T- und B-Lymphozyten sowie CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen bestimmt. Die Messung der Makrophagen und Natürlichen Killerzellen haben diese Bestimmungen ergänzt. Zu keinem Zeitpunkt (2h, 24h und 72h) nach Stimulation mit LPS konnten denervierungsbedingte Veränderungen in den Zellpopulationen der Milz festgestellt werden.

Mit dem Milzgewebe der LPS Tiere wurden außerdem für die Ratte verfügbare Zytokin ELISA unterschiedlicher Firmen ausgetestet. Mit geeigneten Kits ist der IL-1β und IL-2 Gehalt in der Milz gemessen worden. Die IL-1β Konzentration steigt 24Stunden nach LPS Gabe deutlich an. Obwohl die Denervierung in den stimulierten Tieren die IL-1β Konzentration veränderte, brachten diese Ergebnisse keinen deutlichen Aufschluss über die beeinflussten Zellpopulationen. Während die IL-2 Produktion in der frühen Phase der LPS-Stimulation ebenfalls

erhöht ist, kommt bei diesem Parameter zu keiner Veränderung durch die Denervierung der Milz.

Zwei Überlegungen führten nach den LPS Experimenten zu einer Reihe von Versuchen mit anti CD3 Stimulation. Obwohl das Zytokinmuster einen ausreichend starken Reiz impliziert, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auf Grund der niedrigen Dosis und der polyklonalen Stimulation mit LPS die Veränderungen der untersuchten Populationen nicht messbar waren. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass der durch die Denervierung beeinflusste Zelltyp nicht spezifisch genug detektiert wurde und deshalb in der Messung der zellulären Zusammensetzung nicht erkannt werden konnte.

Eine zweite Versuchsreihe mit der Stimulierung der T-Zellen am CD3 Rezeptor wurde genutzt, um kommerziell angebotene Antikörper zur Bestimmung aktivierter T-Lymphozyten zu titrieren. Die Stimulation des CD3 Rezeptors in Kombination mit der Bestimmung aktivierter Zellen wurde daraufhin für die Untersuchung neuro-immuner Interaktionen verwendet. Obwohl dieser Stimulus zur Aktivierung von T-Lymphozyten geeignet ist und die aktivierten Zellen mit den Antikörpern nachweisbar waren, konnten keine sichtbaren Veränderungen der zellulären Zusammensetzung durch die Denervierung festgestellt werden.

Bei der Suche nach einem optimalen Tiermodell wurde die Möglichkeit einer spezifischen Immunantwort mit stark proliferierender Zellen durch allogene Stimulation des Immunsystems in Betracht gezogen. Außerdem bot dieses Modell einen klinischen Bezug zur Organtransplantation. Bei der Host versus Graft Reaktion werden dem parentalen Empfängertier Milzzellen von Tieren der ersten Nachkommengeneration aus der Kreuzung von zwei Inzuchtstämmen injiziert, gegen die das Tier spezifisch antwortet. Ähnlich wie bei den vorherigen Immunstimulie gab es auch bei diesem Model keine eindeutigen Hinweise auf die Modulation des Immunsystems durch noradrenerge Fasern. Als weiteren Versuch einer adäquaten Stimulation wurde das zu dieser Zeit in

der Arbeitsgruppe parallel etablierte Modell der Graft versus Host Reaktion getestet. Dieser Immunreiz führte schließlich in der applizierten Dosis zu denervationsbedingten, sichtbaren Veränderungen der zellulären Zusammensetzung in der Milz, ohne dabei offensichtliche Krankheitszeichen bei den Versuchstieren hervorzurufen.

Die Manipulation des Nervensystems sollte das Verhalten der Tiere ebenfalls nicht beeinflussen. Die chemische Zerstörung der peripheren, noradrenergen Fasern bei Geburt mit 6-OH-DA ist ein etabliertes Verfahren den sympathischen Einfluss auf Immunorgane zu unterbinden. In LPS-, anti CD3 und Host vs Graft- Vorversuchen wurde diese Denervierungstechnik angewendet. Da bei dieser Methode nicht nur die untersuchten Organe von der noradrenergen Innervation getrennt werden, sondern das komplette, noradrenerge Nervensystem zerstört ist, wurde bei den Versuchen mit der GvHR die Milz lokal denerviert. Die Stärke der NA-Reduktion bei der chirurgischen Durchtrennung des Milznerven entspricht der Reduzierung, die bei der chemischen Denervierung in der Milz erreicht wird.

Der spezifische, antigene Immunstimulus während der GvHR und die lokale Milznervdurchtrennung bieten in dieser Kombination optimale Voraussetzungen für die Untersuchungen des noradrenergen Einflusses auf die zelluläre Zusammensetzung und die Zytokinproduktion in der Milz. Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit ein vergleichbares Modell für die Untersuchung neuro-immunologischer Interaktionen im poplitealen Lymphknoten etabliert. Die Techniken und Ergebnisse dieser Arbeiten sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

5. Ergebnisse

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse aus den verschiedenen experimentellen Teilen der Arbeit beschrieben. Der erste Abschnitt behandelt die Ergebnisse zu den Denervierungstechniken, im darauf folgenden Abschnitt werden die Versuche mit systemischer Immunstimulierung dargestellt und der letzte Abschnitt zeigt die Ergebnisse der lokalen GvHR im pLK. Alle aufgeführten Ergebnisse sind mit der Anova-Varianzanalyse statistisch untersucht und als signifikant bewertet, wenn ($p < 0,05$). Die Abweichungen sind als Standardfehler ($\pm SE$) dargestellt.

5.1. Denervierung

5.1.1. Vergleich des NA-Gehaltes in der Milz verschiedener Rattenstämme

Im Methodenteil wurden die verschiedenen Denervierungstechniken beschrieben. Je nach Technik führen sie zu einer systemischen (chemische Denervierung bei Geburt) oder einer lokalen (chirurgische Milznerv-durchtrennung, chemische Denervierung des poplietalen Lymphknotens) Reduzierung des NA. Der Grad der Verminderung der Innervation muss in Relation zum basalen Noradrenalingehalt im Organismus gesehen werden. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Versuche der NA-Gehalt der Milz von unbehandelten Ratten bestimmt. Dieser wurde vergleichend in verschiedenen, gleich großen Milzabschnitten untersucht um sicher zu gehen, dass die NA-Konzentration homogen verteilt ist. Das ist wichtig, da in den späteren Versuchen je ein Milzstück für die Bestimmung der Lymphozytenpopulationen, der Zytokinkonzentration und des Noradrenalingehaltes gebraucht wurde. Die Wahl des Tierstammes für die Experimente wurde u.a. von dem NA-Gehalt abhängig gemacht. Deswegen sind die Messungen in drei verschiedenen Rattenstämmen durchgeführt worden. Untersucht wurden die zwei Endstücke der in 3 gleich

große Teile zerlegten Milz des Auszuchtstammes Wistar Albino (WST) und der Inzuchtstämme Lewis (LEW) und Wistar Kyoto (WKY).

Aus den Messungen der NA-Konzentration und des NA-Gehaltes der Milz (Abb. 5.1-1A+B) wird deutlich, daß der Basalwert in den verschiedenen Rattenstämmen nicht einheitlich ist. LEW-Ratten haben den höchsten, WKY Tiere einen vierfach niedrigeren NA-Gehalt. Während die WST- und WKY-Ratten in den 2 Milzabschnitten die gleiche NA-Konzentration besitzen, zeigt der LEW-Stamm in den beiden Milzteilen eine unterschiedliche NA-Verteilung. Darüber hinaus sind die Lewis Tiere aufgrund ihrer genetischen Disposition sensibel für Autoimmunerkrankungen wie experimentelle autoimmun Encephalomyelitis (EAE), experimentelle-autoimmun-Neuritis (EAN) und autoimmun Thyroiditis. Damit erfüllt dieser Stamm nicht die in dieser Arbeit vorausgesetzten, normalphysiologischen Kriterien.

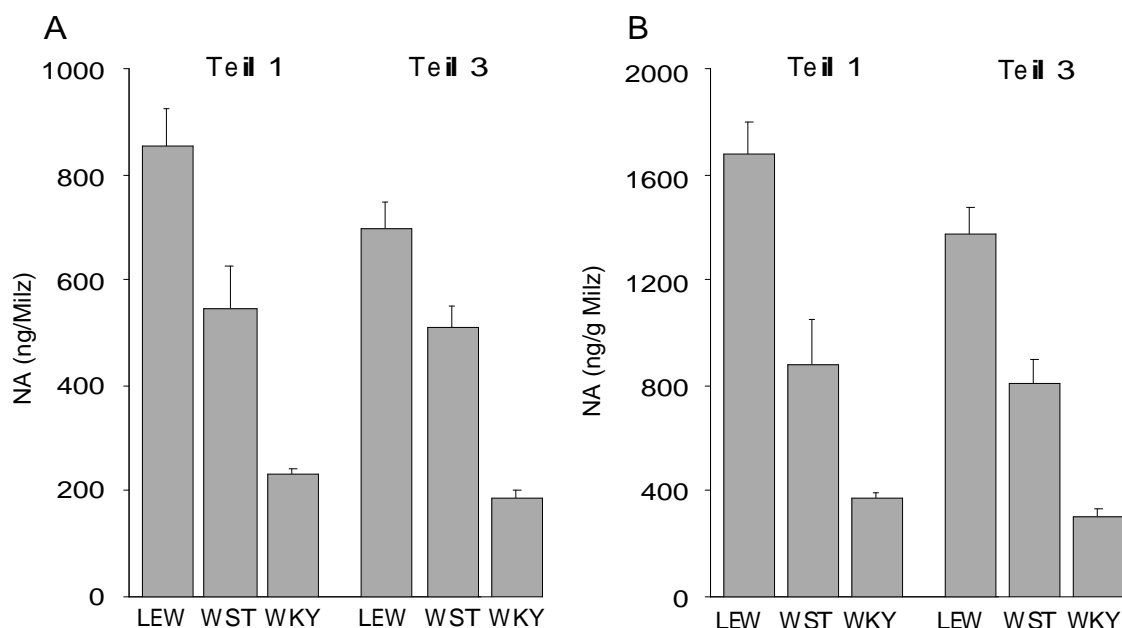


Abb. 5.1-1 Vergleich des Noradrenalingehaltes (A) und der Konzentration in der Milz (B) in den Endstücken (Teil 1+3) einer dreigeteilten Milz von männlichen Lewis (LEW), Wistar (WS) und Wistar-Kyoto (WKY) Ratten (n=5/Gruppe). Der Basalwert in den verschiedenen Rattenstämmen ist unterschiedlich. Lewisratten haben den höchsten NA-Gehalt während WKY Tiere den niedrigsten NA-Gehalt haben. Bei den Wistar- und WKY- Ratten ist der Transmitter in den beiden Milzabschnitten homogen verteilt. Demgegenüber zeigt der Lewis-Stamm in den 2 Milzteilen eine unterschiedliche NA-Verteilung.

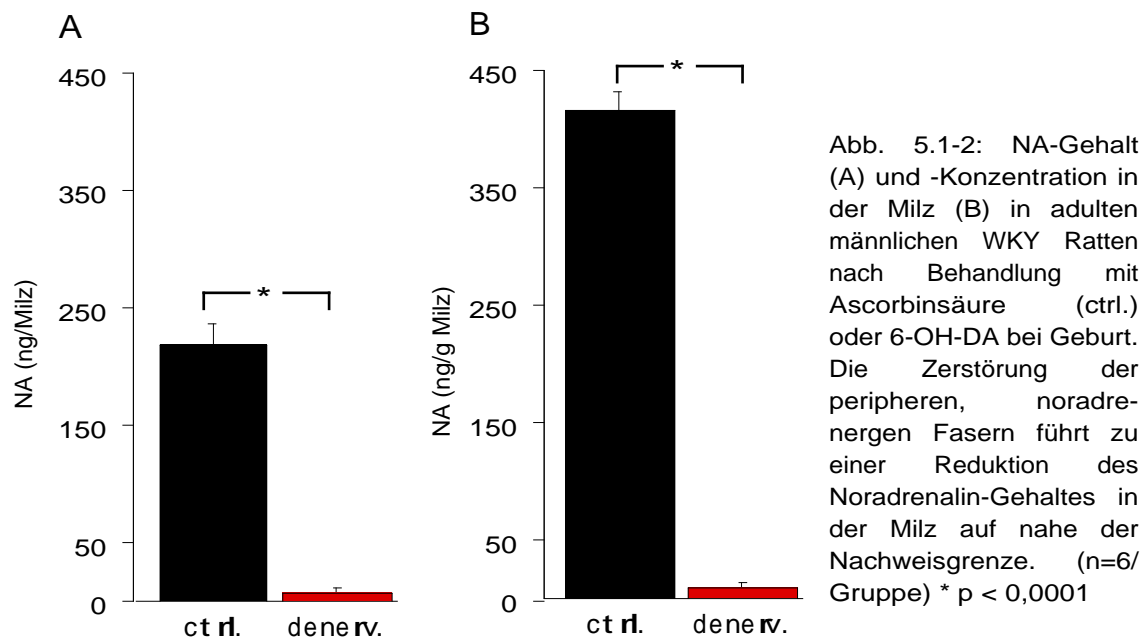
Die Wistar Tiere sind keine Inzuchtratten mit genetischer Homogenität. Für immunologische *in vivo* Versuche, bei denen die Immunstimulation zu unterschwelligen, im Verhalten und dem Erscheinungsbild der Ratten nicht merklichen Immunreaktion führen soll, kann die Varianz zwischen den Tieren eines Auszuchtstammes so groß sein, dass keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Außerdem wurden für die Züchtung der Versuchstiere der GvH Experimente Inzuchtstämme benötigt.

Obwohl in den WKY Tieren der NA-Gehalt der Milz am niedrigsten ist, kann kein Rückschluss auf einen verminderten Einfluss des noradrenergen Systems auf das Immunverhalten dieser Tiere geschlossen werden. Es ist anzunehmen, dass Einflüsse des adrenergen Systems in den WKY Ratten genauso effektiv sind wie in anderen Stämmen. Unter diesem Aspekt und den genannten Nachteilen der anderen, untersuchten Stämme, wurde der WKY Stamm für die Untersuchungen ausgewählt.

5.1.2 Chemische Denervierung mit 6-OH-DA bei Geburt

In den ersten Experimenten dieser Arbeit sind die Tiere bei Geburt auf chemischem Wege denerviert worden. Der NA-Gehalt in den Milzen adulter, männliche WKY Ratten (Abb.4.1-2) und adulter, weiblicher WKY Ratten (Abb.4.1-3) von Tieren die bei Geburt mit 6-OH-DA (denerv.) oder mit Ascorbinsäure (Vehikel) behandelt worden sind zeigen eine deutliche Reduzierung des NA-Gehalts in der Milz.

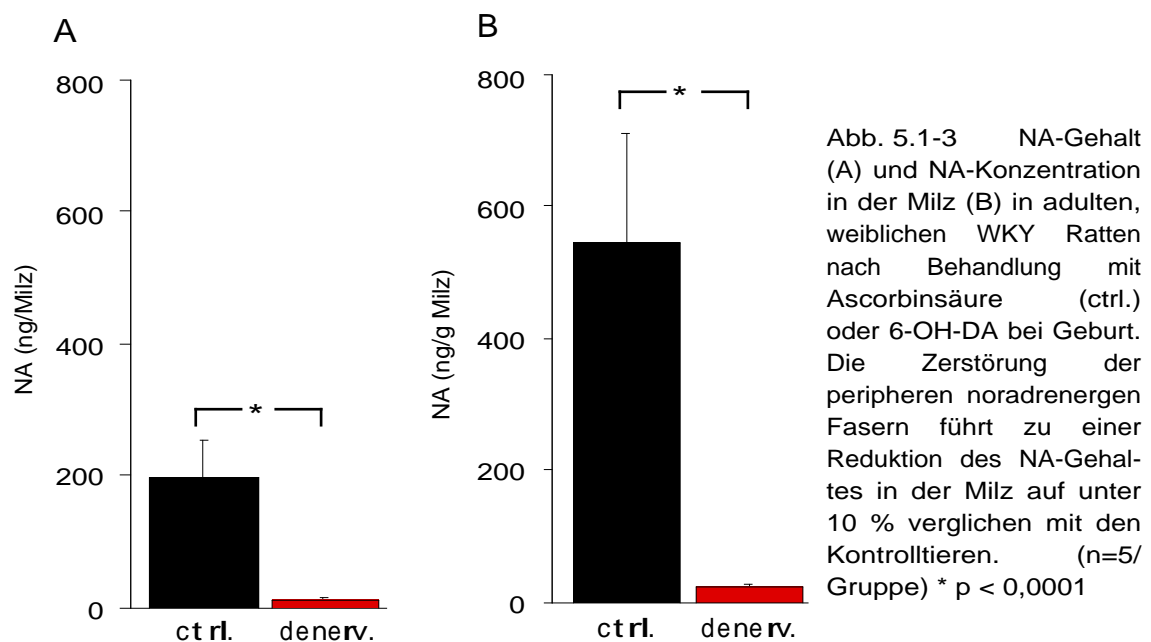
Alle denervierten, männlichen Tiere zeigen eine Reduktion des NA-Gehaltes der Milz auf unter 10 % im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Werte entsprechen den aus der Literatur bekannten Daten (Besedovsky et al., 1979). Die Zerstörung der peripheren noradrenergen Fasern bei der Geburt bleibt lebenslang erhalten. Der NA-Gehalt in weiblichen WKY-Ratten sinkt ebenso wie bei den männlichen Tieren auf unter 10% ab. Der NA-Gehalt liegt so hoch wie



bei den männlichen Tieren. Berechnet man die NA-Konzentration, ist der Wert bei den Weibchen etwas höher, da diese Tiere eine kleinere Milz besitzen. Der Noradrenalingehalt in unterschiedlich großen Milzen bedarf genereller Überlegungen und wird am Ende dieses Abschnitts diskutiert (s.u.).

5.1.3 Chirurgische Sympathektomie der Milz

In einer vergleichenden Versuchsreihe zu den Untersuchungen neuroimmu-



nologischer Wechselwirkungen nach systemischer Zerstörung der noradrenergen Fasern sollte der Einfluss lokaler Denervierung auf das Immunverhalten sekundärer lymphatischer Organe untersucht werden. Die Milz ist als Organ für diese Versuche sehr gut geeignet, da der Milznerv für eine operative Durchtrennung gut zugänglich ist. Die Operation wurde an männlichen WKY- und (WKY x PVG) F1 Ratten, durchgeführt. In den Abbildungen 5.1.-4 und 5.1-5 sind die Ergebnisse der NA-Messungen dargestellt.

Entsprechend der Reduzierung nach chemischer Sympathektomie wird bei der chirurgischen Denervierung der NA-Gehalt der Milz um mehr als 90 % der Konzentration in den Milzen scheinoperierter Ratten vermindert. Das gilt für den WKY-Stamm (Abb. 5.1-4) und für die (WKYxPVG) F1 Tiere (Abb. 5.1-5). Im Vergleich der (WKYxPVG) F1 Tiere mit den WKY Ratten ist der basale Noradrenalingehalt in den nicht denervierten Milzen der (WKYxPVG) F1 Tiere 50 % höher als in den WKY-Ratten. In welchem Maße eine unterschiedlich hohe NA-Konzentration den Einfluß der Innervation auf das Immunsystem verändert, wurde hier nicht untersucht. Dieser Punkt ist in dieser Arbeit ohne Bedeutung, da alle Versuche mit dem selben Stamm durchgeführt werden.

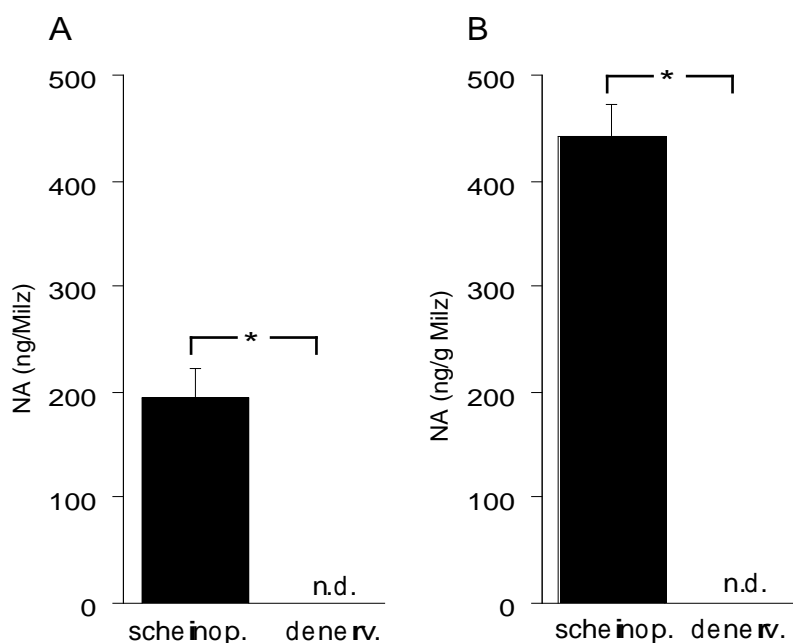
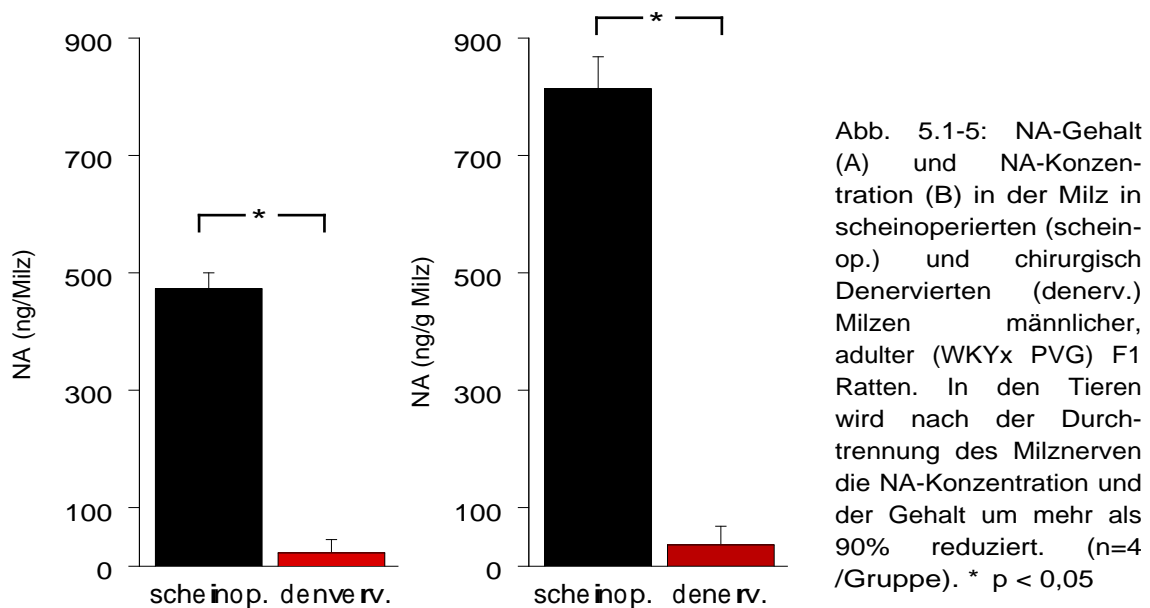


Abb. 5.1-4: NA-Gehalt (A) und NA-Konzentration in der Milz (B) in scheinoperierten (scheinop.) und chirurgisch Denervierten Milzen (denerv.) in adulten männlichen, WKY-Ratten. Die chirurgische Durchtrennung des Nerven reduziert den NA-Gehalts in den Milzen unterhalb der Detektionsgrenze (n.d.). (n=4/Gruppe)
* $p < 0,05$



Anders verhält es sich mit der Milzgröße. Die funktionelle Bedeutung in Bezug auf die NA-Konzentration muss unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert werden:

1. Die Milz ist in rote und weiße Pulpa unterteilt. Ein, oder beide Kompartimente können sich während einer Immunreaktion unabhängig voneinander in ihrer Ausdehnung verändern. Die Ursache können proliferierende Zellklone sein und/oder eine veränderte Perfusion der Milz (Rogausch et al., 1997). Diese Faktoren beeinflussen den NA-Gehalt in den innervierten Arealen.

2. Der NA-Turnover scheint durch Immunreaktionen beeinflusst zu sein (del Rey et al., 1981 und 1982; Rogausch et al., 1997), wodurch Veränderung im NA-Gehalt in der Mikroumgebung der Nerventerminalien entstehen. In der Darstellung des NA-Gehalts der Gesamtmilz und der NA-Konzentration in der Milz wird dieser Aspekt nicht ausreichend wiedergegeben (Punkt 3.). Dies ist vor allem dann relevant, wenn sich das Milzgewicht während einer Immunreaktion verändert.

3. Untersuchungen der Verteilung noradrenerger Fasern in der Milz (Felten et al., 1987; Weihe et al., 1991) zeigen, dass die rote Pulpa mit Ausnahme der

Blutgefäße nicht innerviert ist. Demgegenüber ist die lymphozytenreiche weiße Pulpa noradrenerg versorgt. Unter diesem Gesichtspunkt kommt dem Mengenverhältnis von Erythrozyten zu mononukleären Zellen eine besondere Bedeutung zu, da Veränderungen der Größe der jeweiligen Kompartimente den Gehalt an Substanzen in der Mikroumgebung der Zellen verändern kann.

Wegen der grundlegenden Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse aus den in dieser Arbeit gemachten Messungen wird diese Thematik im Kapitel 6.3 eingehender diskutiert.

5.1.4 Lokale Sympathektomie des poplitealen Lymphknotens mit 6-OH-DA

Die Nachteile einer systemischen Noradrenalinreduktion sind in der Versuchsreihe mit chirurgischer Durchtrennung des Milznerven zur lokalen Denervation vermindert worden. Bei diesen Experimenten mit der GvHR werden den Tieren intravenös allogene Zellen injiziert. Die systemische Immunreaktion beschränkt sich dabei nicht nur auf die Milz, da auch Lymphknoten beteiligt sind. Eine lokale Immunreaktion kann z.B. am pLK provoziert und untersucht werden. Um eine regional begrenzte Immunantwort unter denervierten Bedingungen messen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Modell zur minimalinvasiven Denervierung des pLK etabliert. Der lokale Immunstimulus wird durch die Injektion parentaler LK-Zellen in die Fußsohle induziert. Die Kombination aus lokaler Reduzierung der NA-Konzentration und einer regional begrenzten GvHR bietet eine ausgezeichnete Möglichkeit, die Mechanismen neuro-immunologischer Interaktionen an einem LK zu studieren. Während in den Versuchen der linke pLK denerviert wurde, ist der kontralaterale, rechte pLK zur Kontrolle mit Ascorbinsäure behandelt worden.

Die Abbildung 5.1-6 zeigt den NA-Gehalt im pLK 3 Tage und 8 Tage nach Injektion von 6-OH-DA (denerv.) bzw. Ascorbinsäure (Vehikel) in die Kniekehle. Nach 3 und nach 8 Tagen ist der Na- Gehalt und die NA-Konzentration im pLK

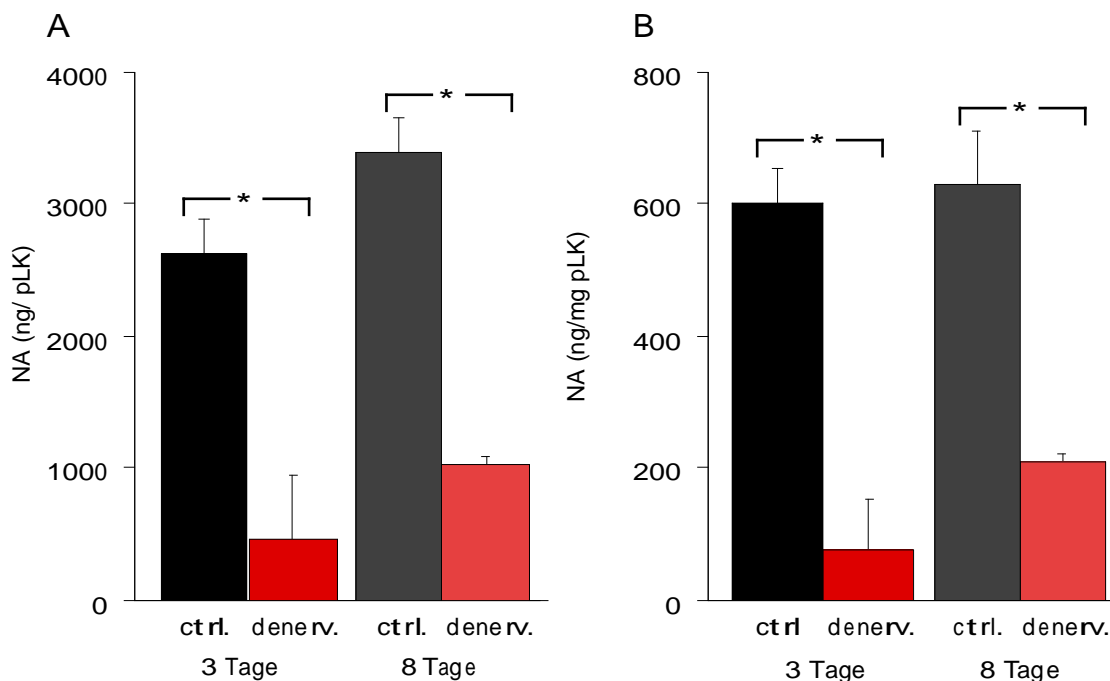


Abb. 5.1-6: NA-Gehalt (A) und NA-Konzentration (B) im pLK 3 Tage (gefüllte Säulen) und 8 Tage (gestreifte Säulen) nach Denervierung mit 6-OH-DA (denerv.) bzw. nach Behandlung mit Ascorbinsäure (Vehikel) in weiblichen (WKYxPVG) F1 Ratten. Der NA-Gehalt im pLK sinkt nach Behandlung mit 6-OH-DA deutlich unter 30 % gegenüber den Kontrollen (vehikel) ab. Acht Tage nach der Denervierung steigt die NA-Konzentration in den LK wieder etwas an.

* $p < 0,05$. 3 Tage: $n=3$, 8 Tage $n=4$

um >70 % reduziert. Beim Vergleich der NA-Konzentration nach 3 und nach 8 Tagen erkennt man einen leichten Anstieg des Neurotransmittergehalts 8 Tage nach Injektion von 6-OH-DA. Wenngleich die beginnende Reinnervation im pLK bislang nicht gezeigt worden ist, konnte in Versuchten mit systemischer Denervierung adulter Tiere dieses Phänomen in anderen Organen beobachtet werden (Finch et al., 1973b; Lorton et al., 1990). Die Zeitpunkte an denen der NA-Gehalt untersucht worden ist entsprechen den Zeitpunkten der Zelinjektion in die Fußsohle (3 Tage nach der letzten Injektion von 6-OH-DA) und der Organentnahme (8 Tage nach 6-OH-DA Injektion).

Die Induzierung der GvHR 3 Tage nach der Denervierung ist aus folgenden Gründen gewählt worden: Die Tiere sind durch die Narkosen und die Injektionen physischem und psychischem Stress ausgesetzt. Die Messung des Stresshormons Kortikosteron im Blut zeigt, dass drei Tage nach der letzten

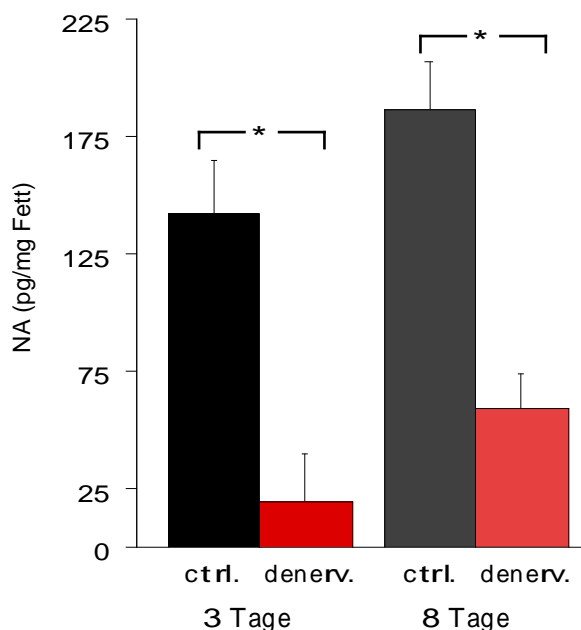


Abb.5.1-7 NA-Konzentration im umliegenden Fettgewebe des pLK. Der NA-Gehalt nimmt auf der denervierten Körperseite (denerv.) signifikant ab gegenüber der mit Ascorbinsäure (ctrl.) behandelten Körperseite. Die NA-Konzentration sinkt auf unter 30 % des Gehalts im Kontrollgewebe ab. Die NA-Reduzierung bleibt 8 Tage nach Injektion von 6-OH-DA bestehen. * $p < 0,05$

Injektion von 6-OH-DA der Blutspiegel dieses Hormons auf Normalniveau zurückgekehrt ist. Zusätzlich kommt es wenige Stunden nach Zerstörung der noradrenergen Fasern zu einer kurzfristigen, hohen NA Freisetzung.

Da für die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung in den GvH Experimenten der ganze Lymphknoten benötigt wurde, musste eine Strategie entwickelt werden, um den Erfolg und die Stärke der Denervierung in jedem Versuchstier zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob die NA-Konzentration des den pLK umgebenen Fettgewebes als Parameter für eine erfolgreiche Denervierung verwendet werden kann.

Unabhängig der dreifach niedrigeren basalen NA-Konzentration im Fettgewebe wird durch die 6-OH-DA Injektion die Neurotransmitter-konzentration im poplitealen Fettgewebe um über 70 % reduziert (Abb. 5.1-7). Um sicher zu sein ob die NA-Konzentrationen des pLK mit dem des zugehörigen Fettgewebes korreliert wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Regressionsgerade in Abbildung 5.1-8 zeigt die Korrelation der NA-Konzentrationen der beiden Gewebe im selben Hinterlauf. Mit dieser Untersuchung wird erstmals gezeigt, dass durch die Denervierung des pLK mit 6-OH-DA die NA-Konzentration im poplitealen Fettgewebe gleichermaßen

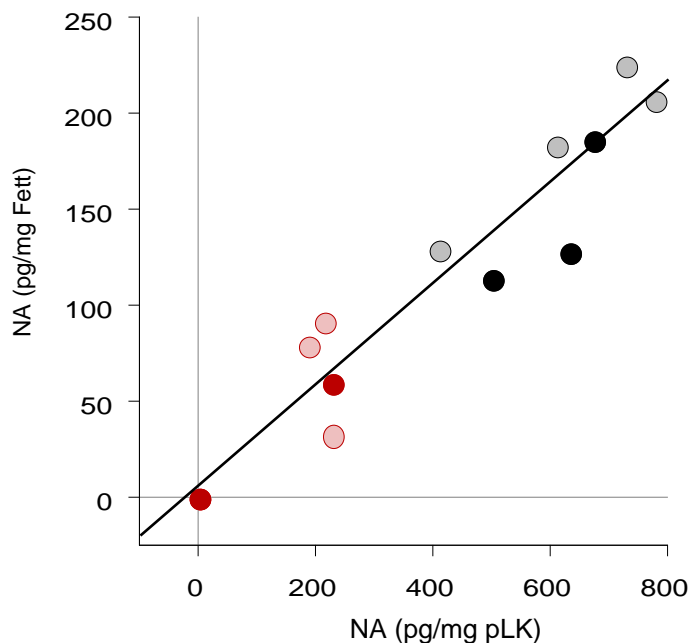


Abb. 5.1-8 Positive Korrelation zwischen der NA-Konzentration im pLK und der NA-Konzentration des zugehörigen poplitealen Fettgewebes. Dargestellt sind die Korrelationen der denervierten Organe 3 Tage (●) und 8 Tage (◐) nach der Injektion von 6-OH-DA sowie der Kontrollorgane 3 Tage (●) und 8 Tage (◐) nach Injektion von Ascorbinsäure. $r = 0,952$; $p < 0,0001$ 3 Tage $n=6$, 8 Tage $n=8$

reduziert ist, wie im LK selbst. Dadurch ist es Möglichkeit, die Denervierung im selben Tier zu kontrollieren ohne parallel Referenztiere verwenden zu müssen.

Die einzige in der Literatur beschriebene Technik zur chemischen Denervierung des pLK (Lorton et al., 1996) führt neben der Reduzierung des NA im pLK zu einer simultanen Denervierung des inguinalen LK (ingLK) und der Milz. Unter diesen Bedingungen ist ein Einfluß auf die zu untersuchenden Auswirkungen der NA-Reduktion im pLK auf eine Immunantwort nicht auszuschließen. Mit der hier erstmals vorgestellten Technik zur Denervierung des pLK werden die ingLK und die Milz in ihrem NA-Gehalt nicht verändert (Abb.5.1.-9, Daten der NA-Messung der Milz nicht gezeigt). Eine veränderte Immunantwort im pLK aufgrund der Denervierung kann deshalb auf die Zerstörung der noradrenergen Nervenfasern des pLK zurückgeführt werden. Die Veränderung der Immunantwort wird nicht durch eine gleichzeitige NA-Reduzierung in anderen lymphatischen Organen beeinflusst.

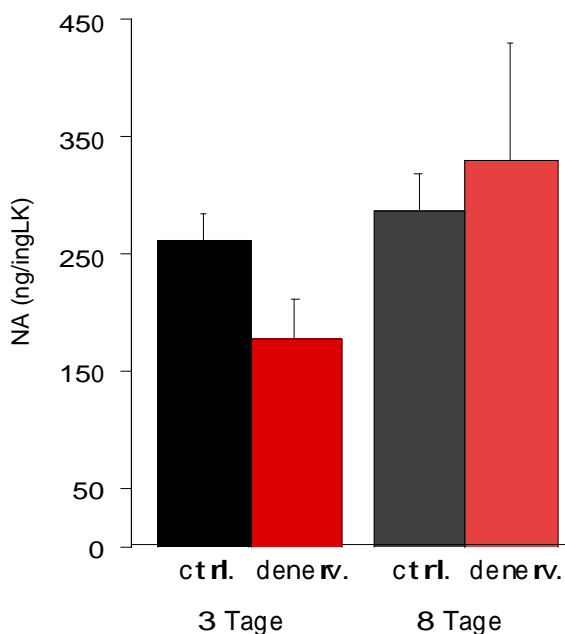
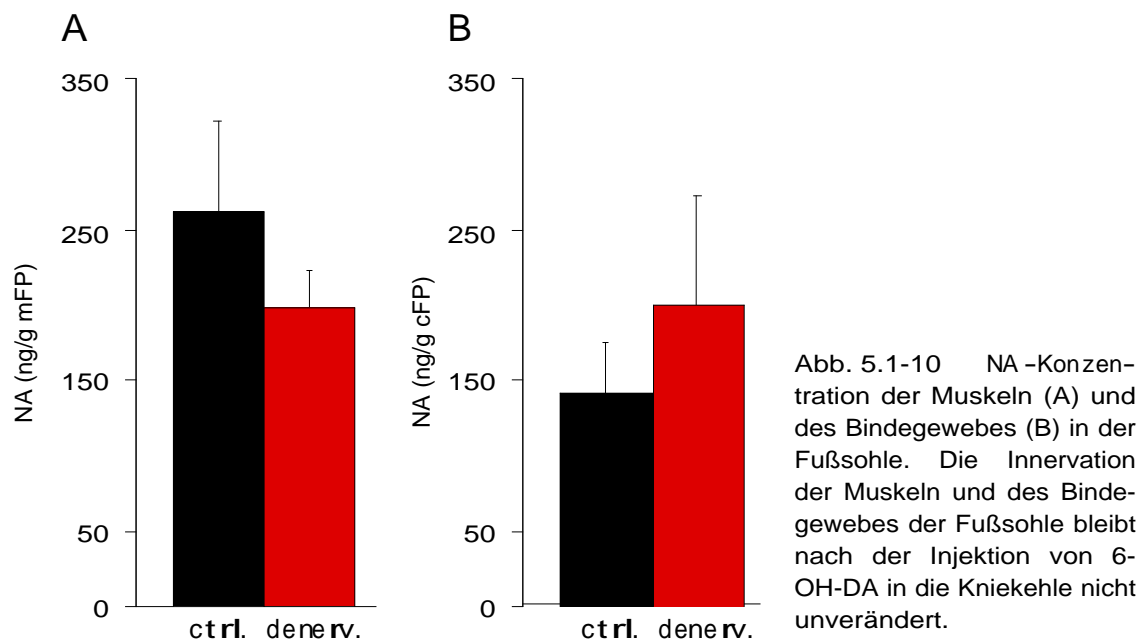


Abb. 5.1-9 Einfluß der 6-OH-DA Behandlung der Kniekehle auf die NA-Konzentration der inguinalen LK (ingLK) 3 Tage und 8 Tage nach den Injektionen. Im ingLK sind nach der lokalen Zerstörung der noradrenergen Fasern im pLK keine veränderten Noradrenalinwerte festzustellen. Lediglich 3 Tage nach der Injektion ist im ingLK eine tendenzielle Reduzierung der NA-Konzentration zu beobachten.

Zusätzlich sollte gewährleistet sein, dass auch der Injektionsort der parentalen Zellen normal innerviert bleibt, wenn 6-OH-DA in die Kniekehle injiziert wird. Daher ist der NA-Gehalt der subcutane Muskulatur (mFP) und des subcutanen Bindegewebes (cFP) der Fußsohlen der Tiere gemessen worden. Die Abbildung 5.1-10 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Die noradrenerge Innervation der Muskulatur und des Bindegewebes werden durch die Denervierung der pLK nicht beeinträchtigt. Die Aufnahme parentaler Zellen über die subcutane Injektion in die Fußsohle findet unter normaler, noradrenerger Innervation dieser Körperregion statt. Die Antigenerkennung durch Antigen präsentierende Zellen am Ort des Eintritts in den Körper wird nicht durch eine veränderte NA-Konzentration beeinflusst.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten belegen eindrucksvoll die Wirksamkeit der Denervierung des poplitealen LK mit dieser neuen Technik. Sie hat gegenüber der in der Literatur beschriebenen Technik zur Denervation des pLK (Lorton et al., 1996) folgende Vorteile:

Mit dieser Methode bedarf es keiner chirurgischen Eröffnung der Cavität des Knies. Dadurch wird eine mögliche Zerstörung afferenter und efferenter Lymphgefäße minimiert und ein uneingeschränkter Lymphfluß ist weiterhin



gewährleistet. Gleiches trifft auf die Blutversorgung des pLK zu.

Die Dosierung des Neurotoxins ist soweit optimiert, dass es den NA-Gehalt im pLK um 70% reduziert, ohne dabei die Innervation anderer lymphatischer Organe wie die Milz oder die ingLK zu verändern.

Ein weiterer Vorteil ist der geringere Behandlungsstreß, da die Denervierung minimalinvasiv durchgeführt wird. Ebenso wird die Möglichkeit operationsbedingter Infektionen minimiert.

Zusätzlich konnten wir durch Messungen der NA-Konzentration in der Fußsohle zeigen, dass durch die Injektion von 6-OH-DA in die Kniekehle der Ort der Antigenaufnahme in den Körper normal innerviert ist. Die Antigenerkennung durch APC kann entsprechend den Bedingungen in einem normalen Tier stattfinden.

5.2 Systemische Graft versus Host Reaktion (GvHR)

Die GvHR ist eine semiallogene Reaktion, bei der die "implantierten Lymphozyten" (Donor Milzzellen) gegen die MHC Loci der Zellen des Empfängers reagieren. Dabei kommt es zu einer antigenspezifischen Stimulation der Donorzellen, in deren Folge Mediatoren des Immunsystems freigesetzt werden. Bei der Untersuchung dieser Immunstimulation unter dem Aspekt des noradrenergen Einflusses, sind die folgenden Bestimmungen durchgeführt worden:

- der Index aus Milzgewicht/Körpergewicht als Parameter für die Stärke der Immunantwort
- Zählung der Erythrozyten und Leukozyten in der Milz
- Noradrenalingehalt der Milz
- Kortikosteronspiegel im Plasma
- die zelluläre Zusammensetzung der Milz
- die Messung der Zytokinfreisetzung in der Milz

In den Versuchen sind männliche (WKYxPVG) F1 Tiere als Rezipienten verwendet worden. Die Ratten waren zwischen 10 und 13 Wochen alt bei einem Körpergewicht von 230-330g. Sieben Tage nach der operativen Durchtrennung des Milznerven bzw. der Scheinoperation, wurden den Tieren die Spenderzellen intravenös injiziert. Die Kontrolltiere erhielten Milzzellen vom selben Stamm und Geschlecht (syngen), den stimulierten Tieren wurden parentale Milzzellen von männlichen PVG Ratten (allogen) gespritzt. 10 Tage nach Inokkulation der Zellen wurden die Organe, Milz und Blut, entnommen.

5.2.1 Allgemeine Bestimmungen

Index aus Milzgewicht/Körpergewicht

Die Ratten die eine GvHR durchmachen haben gegenüber den Kontrolltieren einen signifikant höheren Index (Milzgewicht/Körpergewicht x 1000) (Abb. 5.2-

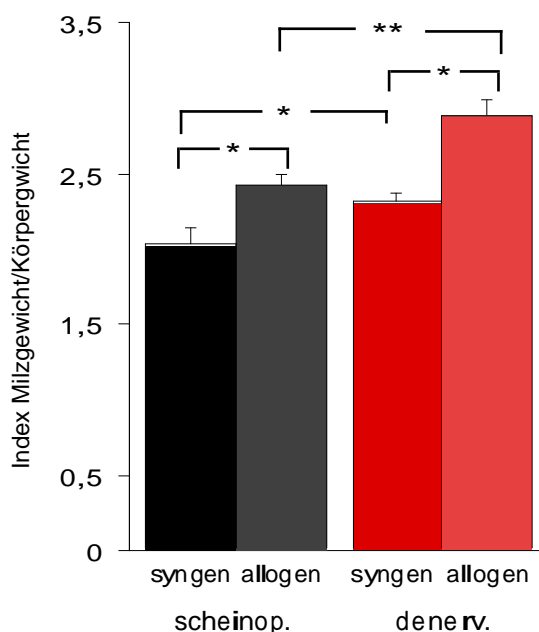


Abb. 5.2-1 Index aus Milzgewicht/Körpergewicht während GvHR (allogen) bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach chirurgischer Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. Nach Injektion allogener Zellen steigt der Index gegenüber den Kontrolltieren signifikant an (syngen vs allogen). Die Denervierung führt in den Kontrolltieren und in den immunstimulierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

1). Die NA-Reduktion führt in den Kontrolltieren und in den Ratten mit einer GvHR zu einem signifikanten Anstieg des Index. Die Kombination aus Denervierung und Stimulierung des Immunsystems führt zu der größten Zunahme des Indexes. Die Änderung des Milzgewichtes der Versuchstiere (Abb. 5.2-2) entsprechen dem jeweiligen Index der Tiere. Da sich das Körpergewicht während des Versuchs nicht geändert hat (Daten nicht gezeigt), ist das Milzgewicht verantwortlich für die unterschiedlichen Indizes. Das höchste Milzgewicht ist in den denervierten Tieren, die einer GvHR ausgesetzt sind, gemessen worden. Diese Gruppe hat einen signifikant höheren Wert als die nicht denervierten Tiere die eine GvHR durchmachen.

Erythrozyten- und Leukozytenzahl in der Milz

Nach der Organentnahme wurde aus der Primärmilzzellsuspension die Zahl der roten und weißen Blutzellen bestimmt. Sowohl die GvHR als auch die Denervierung der Milz führt zum Ansteigen der Erythrozytenzahl (Abb.5.2-3). In den Tieren mit einer GvHR bei denen der Milznerv durchtrennt worden ist, kommt es dadurch zu der größten Zunahme roter Blutkörperchen in der Milz.

Die Zahl der Leukozyten in der Milz steigt während der GvHR an (Abb. 5.2-4). Im Gegensatz dazu führt die Denervierung zu einer Abnahme der Zahl

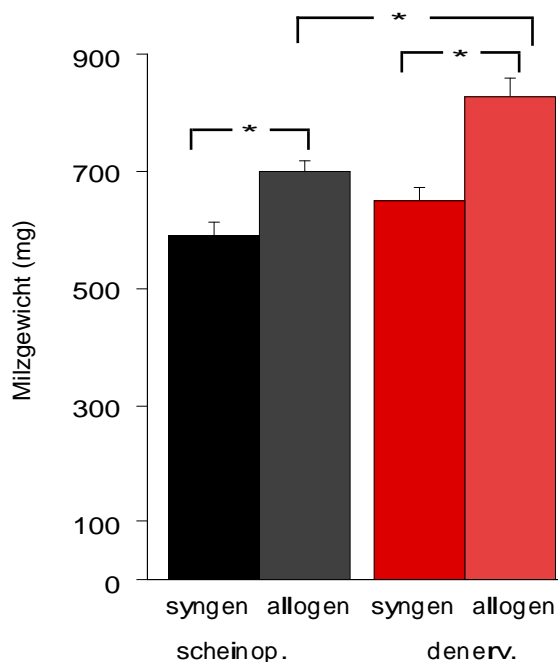


Abb. 5.2-2 Milzgewicht in Tieren nach der Injektion parentaler Zellen (allogen) und in Kontrolltieren (syngen) nach chirurgischer Durchtrennung des Milznerven oder nach Schein-operation. Die Immunstimulation führt zu einem signifikantem Anstieg des Milzgewichts. Während die Denervierung das Milzgewicht in den Tieren, die einer GvHR ausgesetzt sind erhöht, verändert sich das Milzgewicht in den Kontrolltieren durch die NA-Reduzierung nicht. * $p < 0,05$

nukleärer Zellen in der Milz. Während diese Reduzierung in den Tieren, die einer GvHR unterzogen sind, signifikant ist, kommt es in den Kontrolltieren nur zu einer leichten Abnahme.

Die bedeutendste Aussage dieser Experimente für diese Arbeit liegt in der

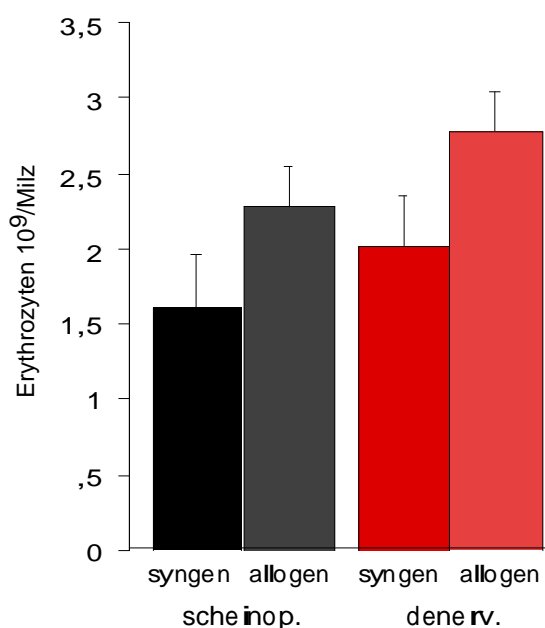


Abb. 5.2-3 Erythrozytenzahl in der Milz in immunstimulierten Tieren oder in Kontrolltieren mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. Tendenziell steigt die Erythrozytenzahl in den Tieren, die eine GvHR durchmachen, an. Auch die Denervierung erhöht die Erythrozytenzahl in den Kontrolltieren und den immunstimulierten Tieren (denerv. vs scheinop.).

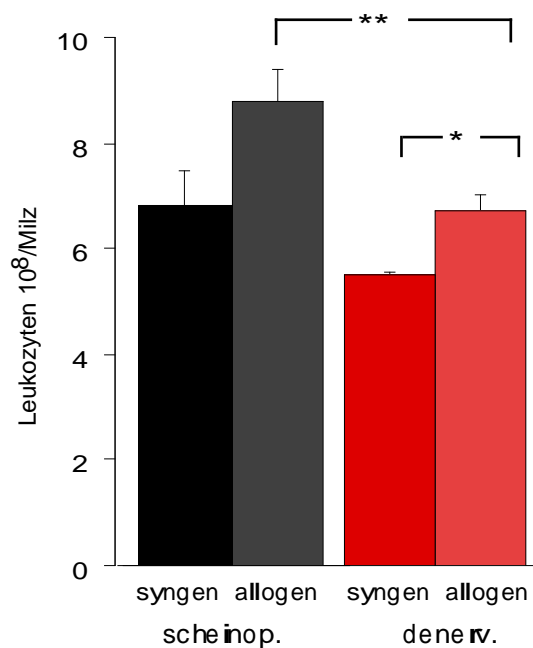


Abb. 5.2-4 Leukozytenzahl in der Milz (A) in Tieren die mit parentalen Zellen injiziert worden sind (allogen) bzw. in Kontrolltieren (syngen) mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. Nach Injektion parentaler Zellen steigt die Leukozytenzahl in der Milz signifikant an. Während die Denervierung in den Tieren mit einer GvHR die Leukozytenzahl deutlich reduziert, kommt es in den Kontrolltieren nur zu einer schwachen Abnahme dieser Zellen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Reduzierung der Leukozytenzahl durch die Denervierung und dass dieses Phänomen während der Stimulation des Immunsystems noch stärker ausgeprägt ist.

Index aus Erythrozyten/Leukozyten in der Milz

Das Verhältnis der Erythrozytenzahl zu der Leukozytenzahl in der Milz

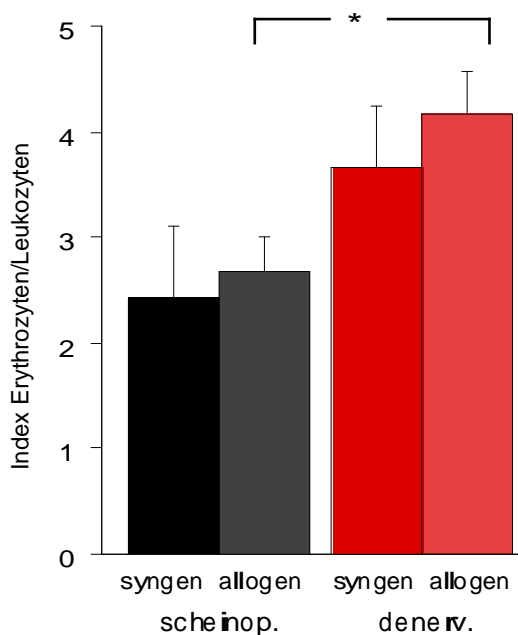


Abb. 5.2-5 Index aus Erythrozytenzahl/Leukozytenzahl in Kontrolltieren (syngen) und immunstimulierten Tieren (allogen) in scheinoperierten (scheinop.) und denervierten (denerv.) Ratten. Die Immunreaktion (allogen) führt zu keiner Veränderung des Indexes. Demgegenüber führt die Denervierung der Milz zu einer sichtbaren Zunahme des Indexes, der in den immunstimulierten Tieren signifikant ist. * $p < 0,02$

beschreibt die proportionale Verteilung der roten und weißen Pulpa in diesem Organ, wenn die Zellen als Parameter für die Größe der Kompartimente herangezogen werden. Mit dieser Berechnung wird die relative Veränderung der Erythrozytenzahl gegenüber der Leukozytenzahl der Milz dargestellt (Abb. 5.2-5). Während der Index nach Injektion der Tiere mit parentalen Zellen unverändert bleibt kommt es in den denervierten Tieren, die eine GvHR durchmachen, zu einem deutlichen Anstieg des Index. Diese Daten verdeutlichen den proportional stärkeren Anstieg der Erythrozytenpopulation in der Milz gegenüber den nukleären Zellen während einer GvHR, wenn die Milz denerviert ist. Der stärkere Anstieg des Indexes in den immunisierten Tieren mit durchtrenntem Nerv gegenüber den denervierten Kontrolltieren begründet sich auf der gesunkenen Leukozytenzahl in diesen Milzen.

Noradrenalingehalt der Milz

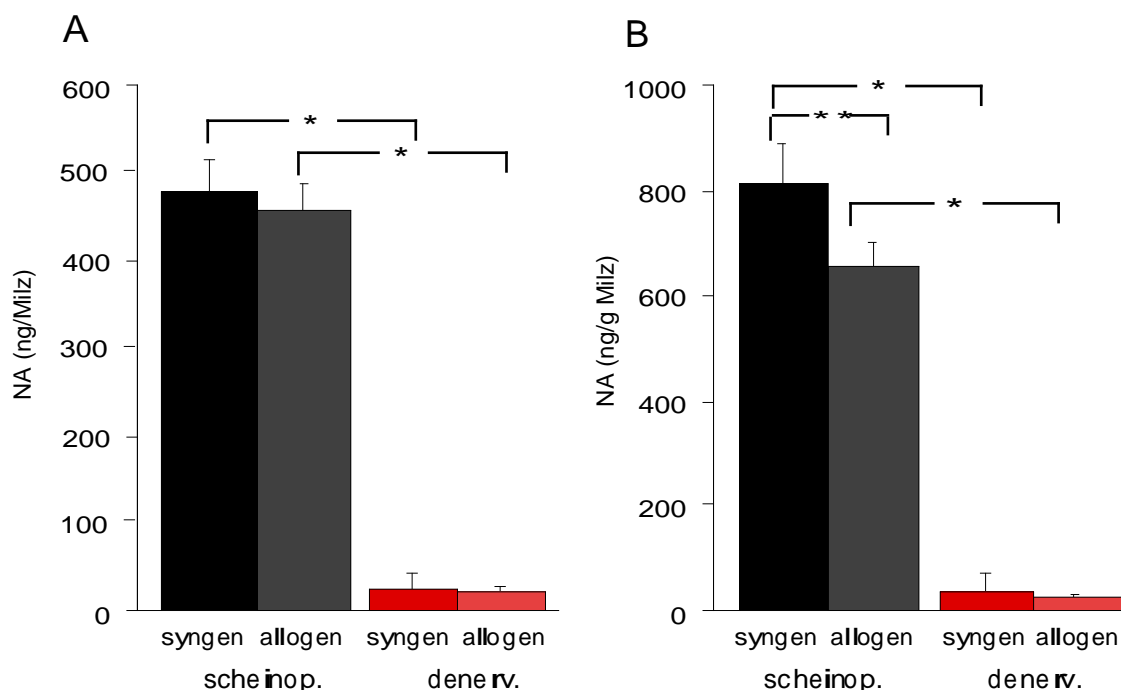


Abb. 5.2-6 NA-Gehalt (A) und NA-Konzentration in der Milz (B) in immunstimulierten Tieren (allogen) und Kontrolltieren (syngen) nach chirurgischer Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. A: Der NA-Gehalt in den denervierten Milzen sinkt unter 10% verglichen mit den Milzen scheinoperierter Tiere. Der NA-Gehalt verändert sich kaum, wenn den Tiere mit intakter Innervation parentalen Zellen injiziert werden. B: Die Immunstimulation *per se* reduziert die NA-Konzentration signifikant in den scheinoperierten Tieren. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,03$

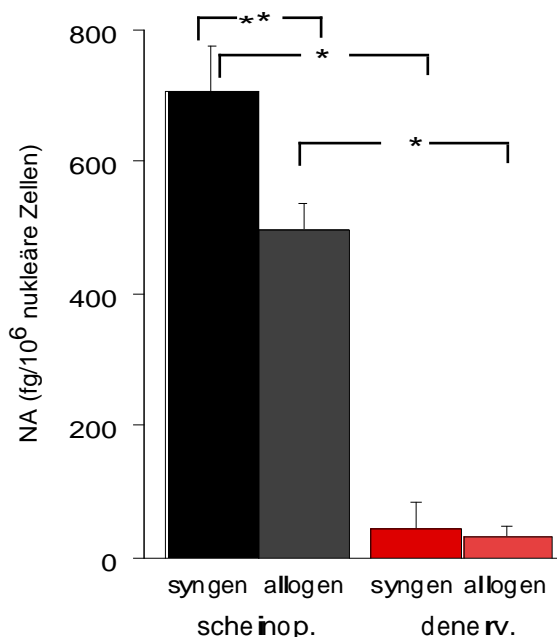


Abb. 5.2-7 NA-Gehalt bezogen auf 10⁶ nukleäre Zellen in Tieren die einer GvHR unterzogen sind (allogen) und in Kontrolltieren (syngen) mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (schein-op.) Tieren. Die Denervierung reduziert den NA-Gehalt in der Milz auf unter 10% (scheinop. vs denerv.). Der NA-Gehalt in den stimulierten Tieren (allogenen) nimmt gegenüber den Kontrollratten signifikant ab. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,05$

Die Messung des Noradrenalins (NA) in der Milz dient in erster Linie der Überprüfung der Transmitterreduzierung in den denervierten Tieren. Wie erwartet führt die chirurgische Durchtrennung des Milznerven zu einem Rückgang des NA-Gehalts auf weniger als 10 % (Abb. 5.2-6A). Obwohl die Untersuchung der NA-Konzentration (Abb. 5.2-6B) in der innervierten Milz nicht zu den hauptsächlichen Bestimmungen in der Zielsetzung dieser Arbeit gehört, müssen die Ergebnisse aufgrund ihrer Bedeutung gezeigt werden. Der NA-Gehalt der Gesamtmilz in Tieren die eine GvHR durchmachen ist ähnlich dem Gehalt in den Milzen der Kontrolltiere. Demgegenüber wird die Konzentration des Neurotransmitters in den Milzen der Tiere die eine GvHR durchmachen signifikant verringert im Vergleich mit den Tieren denen syngene Zellen injiziert worden sind. Ist die NA-Konzentration in Bezug auf die Zahl nukleärer Zellen in der Milz berechnet (Abb. 5.2-7), ist die Reduzierung in den immunstimulierten Tieren mit intakter Innervation noch stärker ausgeprägt. Die mögliche Bedeutung dieser Tatsache wird im Abschnitt 6.2 eingehender diskutiert.

Kortikosteron

Kortikosteron wird während Stresssituationen verstärkt ins Blut freigesetzt. Die Bestimmung dieses Hormons ist bedeutsam, weil Kortikosteron Immunre-

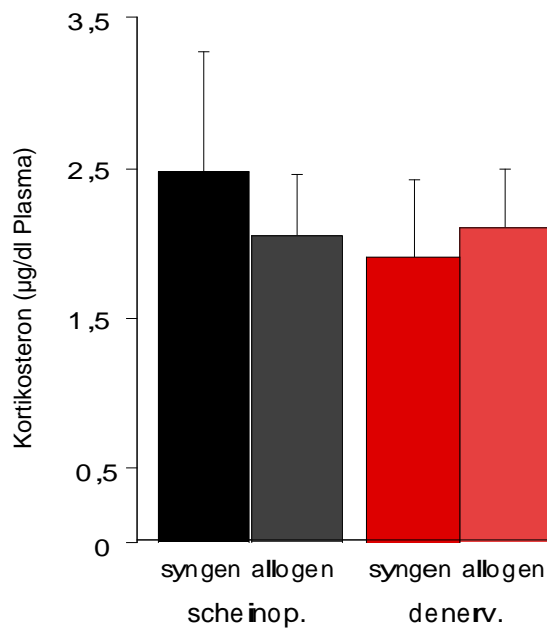


Abb. 5.2-8 Kortikosteron - Konzentration im Plasma zum Zeitpunkt der Organentnahme in den untersuchten Tieren. Es sind keine Veränderungen des Kortikosteronspiegels im Plasma der Versuchsgruppen zu sehen.

aktionen beeinflussen kann. Die Messung im Blut der Versuchstiere wurde durchgeführt, um mögliche Beeinflussungen der Ergebnisse durch Veränderungen im Kortikosteronspiegel ausschliessen zu können. Zum Zeitpunkt der Organentnahme (10 Tage nach Zellinokultion) ist die Kortikosteronkonzentration im Blut in allen Versuchsgruppen ähnlich (Abb. 4.2-8). Es kann also davon ausgegangen werden, daß mögliche Veränderungen in der Milz der Versuchstiere nicht durch veränderte Kortikosteronwerte verursacht worden sind.

5.2.2 Zelluläre Zusammensetzung in der Milz während GvHR

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Milz nach chirurgischer Durchtrennung des Milznerven in (WKYxPVG) F1 Ratten, 10 Tage nach intravenöser Induktion einer GvHR. Die Phenotypisierung der Subpopulationen erfolgt mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine (clusters of differentiation, CD) der Zellpopulationen.

B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind mit einem spezifischen Maus anti-Ratte CD45RA Antikörper bestimmt worden. Das CD45RA Oberflächenprotein wird nur auf B-Lymphozyten von Ratten exprimiert.

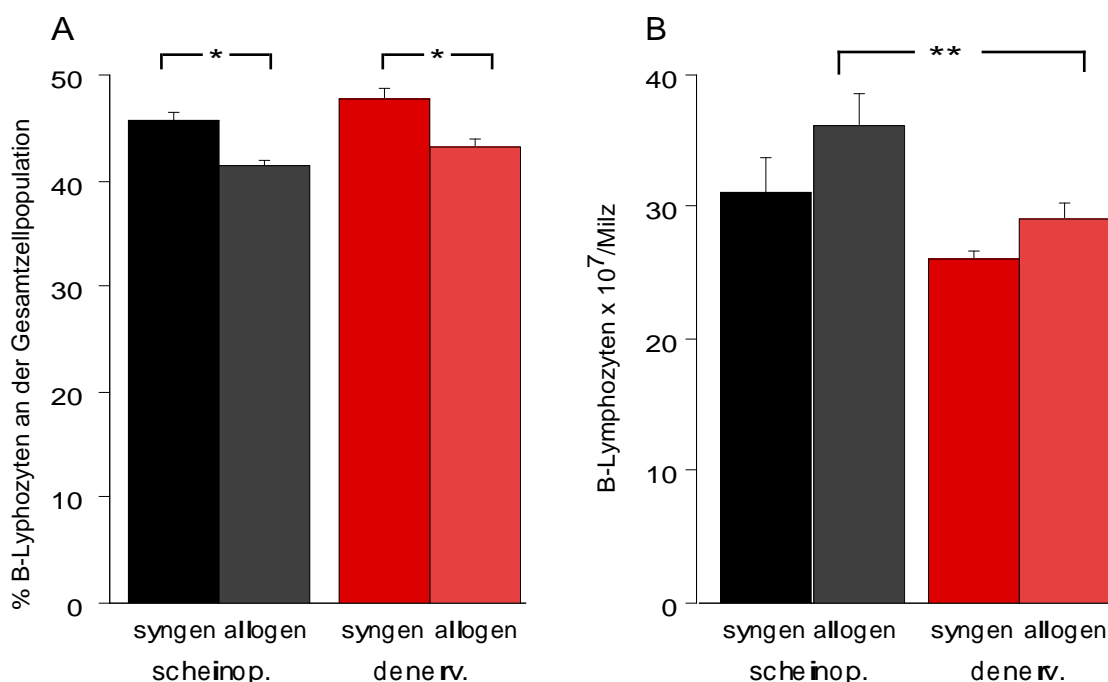


Abb. 5.2-9 % B-Lymphozyten von nukleären Zellen (A) und absolute B-Lymphozytenzahl (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. A: Der prozentuale Anteil an B-Lymphozyten ist zum Zeitpunkt der Untersuchung der GvHR signifikant erniedrigt. Die Denervierung bewirkt keine sichtbare Veränderung gegenüber den scheinoperierten Milzen. B: Die absolute Zellzahl der B-Lymphozyten steigt durch die GvHR leicht an. Während die Denervierung in den immunstimulierten Tieren die B-Zellzahl signifikant erniedrigt, kommt es in den Kontrolltieren nur zu einer leichten Abnahme. * $p < 0,01$ ** $p < 0,02$.

Die Injektion parentaler Milzzellen führt zu einer signifikanten Reduzierung des prozentualen Anteils CD45RA positiver Zellen in der Milz (Abb. 5.2-9A). Aufgrund der zunehmenden Zahl nukleärer Milzzellen steigt die absolute Zahl der B-Lymphozyten während der GvHR an (Abb. 5.2-9B). Während die Denervierung *per se* keinen Einfluss hat, wird die absolute Zahl in den immunstimulierten Tieren durch die fehlende Innervation signifikant vermindert.

T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind mit einem spezifischen Maus anti-Ratte CD5 Antikörper nachgewiesen worden, der auf Thymozyten und T-Lymphozyten exprimiert wird, nicht jedoch auf NK-Zellen. CD5⁺ Ratten B-Lymphozyten sind bislang nicht

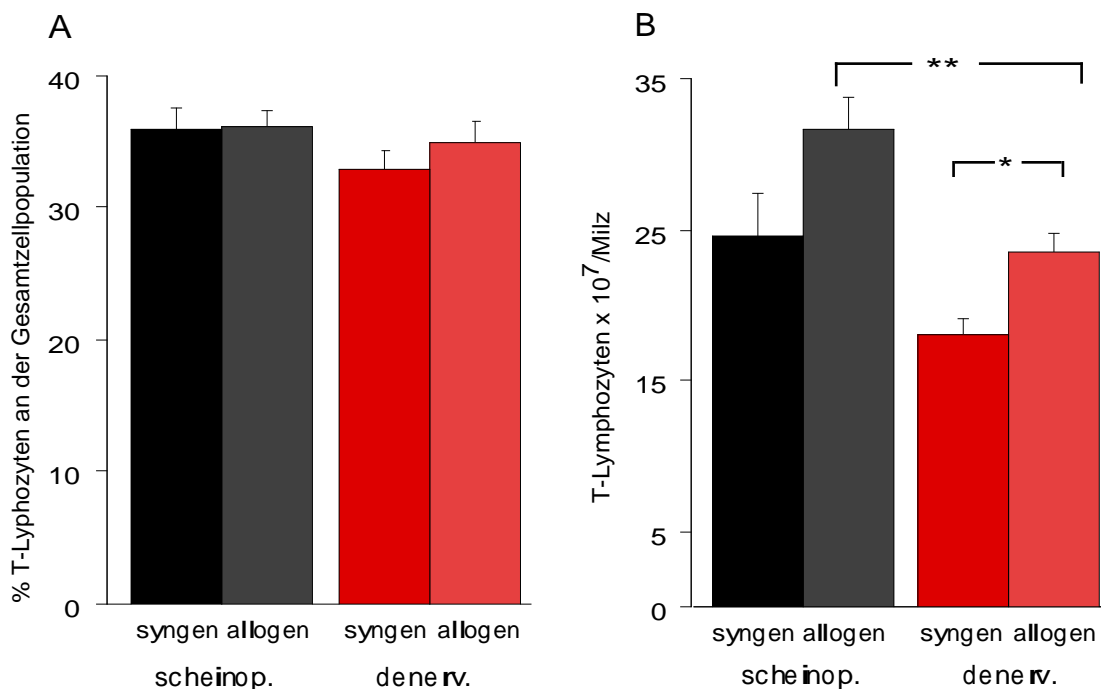


Abb. 5.2-10 % T-Lymphozyten von nukleären Zellen (A) und absolute T-Lymphozyten (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. A: Der prozentuale Anteil an T-Lymphozyten wird durch die Denervierung und durch die Immunstimulation nicht verändert. B: 10 Tage nach Beginn der GvHR ist die absolute T-Lymphozytenzahl in der Milz angestiegen. Diese Zunahme ist in den denervierten Tieren signifikant. Während in den Kontrolltieren die Denervierung nur zu einer schwachen Abnahme der Zellzahl führt, kommt es in den Tieren die einer GvHR unterzogen sind, zu einer signifikanten Reduzierung dieser Population. * $p < 0,01$; * * $p < 0,05$

charakterisiert worden.

Die Anteile der T-Lymphozytenpopulation in der Milz werden weder durch die Denervierung noch durch die Injektion parentaler Zellen verändert. Demgegenüber steigt die absolute Zahl CD5⁺ Lymphozyten in der Milz an, wenn die Tiere eine GvHR durchmachen (Abb. 5.2-10 B). Wird jedoch der Milznerv in den Tieren durchtrennt, kommt es nach Stimulation der Ratten mit parental Zellen zu einer signifikanten Abnahme der T-Lymphozytenzahl in der Milz.

CD4⁺ Lymphozyten

CD4⁺ T-Lymphozyten sind mit einem spezifischen Maus anti-Ratte CD4 Antikörper nachgewiesen worden, der auf T-Helferzellen, Thymozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Die Verwendung dieses

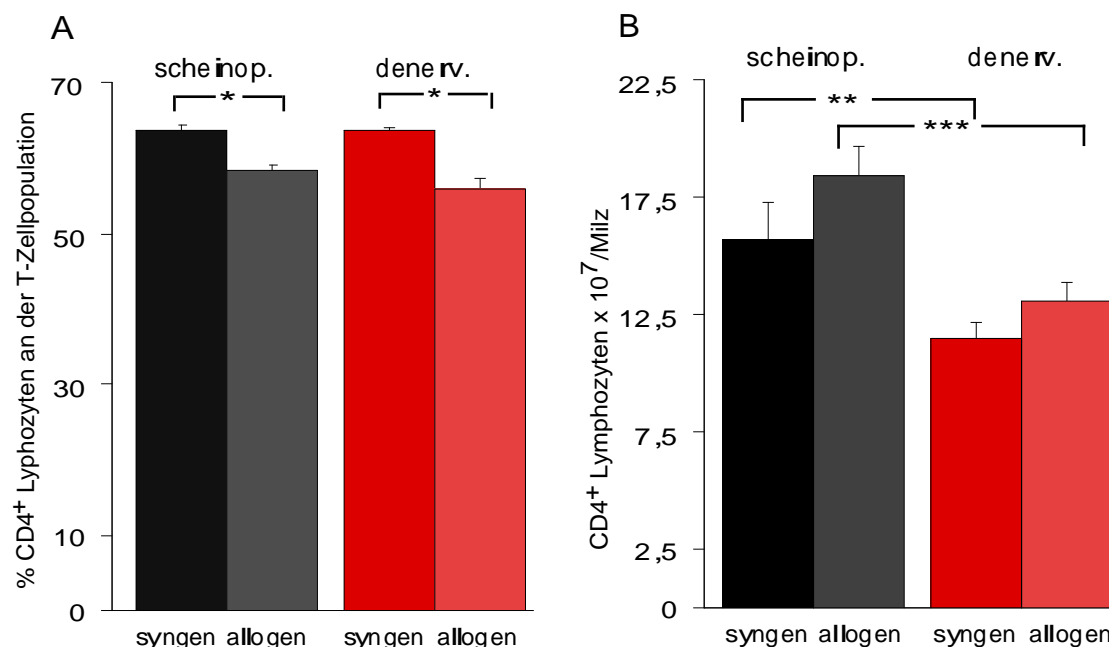


Abb. 5.2-11 % CD4⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute CD4⁺ Zellzahl (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). A: Der Anteil CD4⁺ Zellen wird während der GvHR signifikant reduziert (allogen vs syngen). Die Denervierung *per se* verändert die prozentualen Anteile CD4⁺ Zellen an der gesamt- T-Zellpopulation nicht. B: Die absolute Zahl CD4⁺ Lymphozyten in der Milz steigt während der allogenen Reaktion leicht an. Im Gegensatz dazu vermindert die Denervierung der Milz die absolute Zahl Tieren signifikant. * p<0,01; ** p<0,05; *** p<0,003

Antikörpers in Kombination mit dem anti-CD5 Antikörper erlaubt die Bestimmung der prozentualen Anteile CD4⁺ Zellen an der T-Lymphozytenpopulation. Dadurch werden Makrophagen und Monozyten bei der Bestimmung der CD4⁺ Lymphozyten nicht gewertet.

Während der prozentuale Anteil CD4⁺ Zellen an der T-Lymphozytenpopulation in der Milz von Tieren die einer GvHR ausgesetzt sind signifikant vermindert wird (Abb.5.2-11A), steigt die absolute Zahl in den immunstimulierten Tieren leicht an. Im Gegensatz dazu führt die Denervierung zu einer signifikanten Abnahme der absoluten Zahl CD4⁺ Lymphozyten (Abb.5.2-11B).

CD8⁺ Lymphozyten

Die CD8⁺ T-Lymphozyten sind mit einem spezifischen Maus anti-Ratte CD8 Antikörper nachgewiesen worden, der mit der β -Kette des CD8 Antigens auf

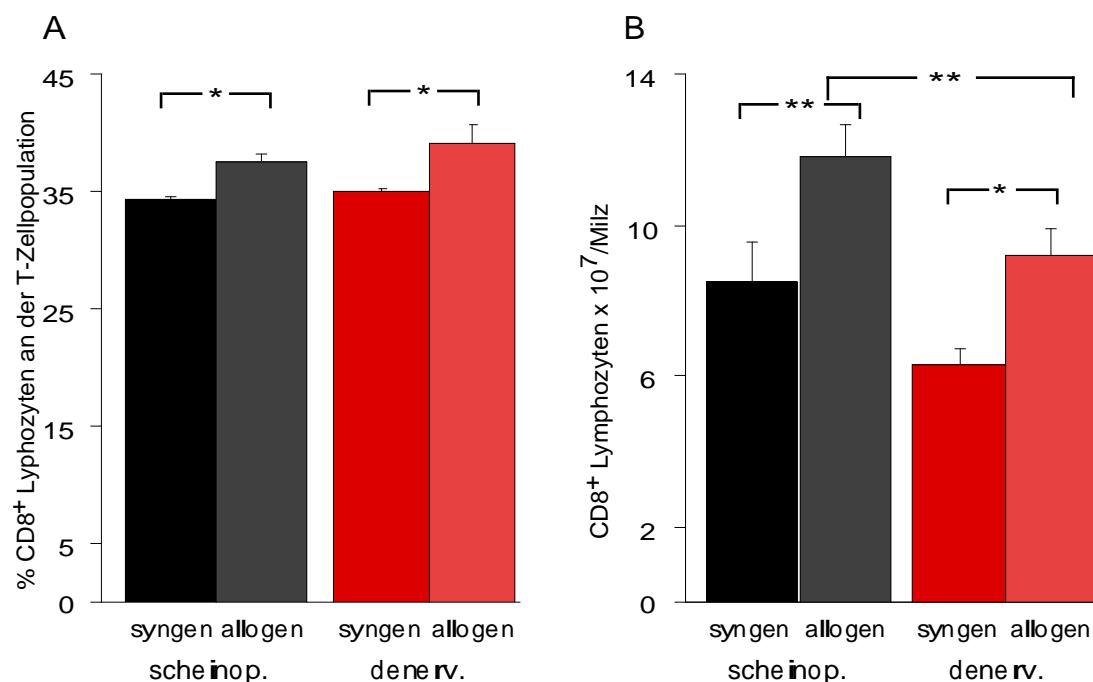


Abb. 5.2-12 % CD8⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute CD8⁺ Lymphozyten (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. A: Der prozentuale Anteil CD8⁺ Lymphozyten an der T-Lymphozytenpopulation ist 10 Tage nach Beginn der GvHR signifikant erhöht (allogen vs syngen). B: Die Zahl CD8⁺ Lymphozyten in der Milz immunstimulierter Tiere ist deutlich erhöht. Demgegenüber wird die absolute Zahl CD8⁺ Zellen nach Durchtrennung des Milznerven in den Tieren die einer GvHR unterzogen sind signifikant reduziert. * p<0,03; ** p<0,05

den meisten Thymozyten und thymusabhängigen, zytotoxischen T-Zellen und Supressorzellen reagiert. Die hier dargestellten CD8⁺ Lymphozyten sind mit dem anti-CD5⁺ Zellmarker doppelt markiert.

In der Milz immunstimulierter Tiere kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils CD8⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (Abb.5.2-12) und der absoluten Zahl CD8⁺ Zellen (Abb.5.2-12). Während die Denervierung der Milz die Anteile CD8⁺ Zellen nicht verändert, wird die absolute Zahl dieser Zellpopulation in der denervierten Milz immunstimulierter Tiere signifikant reduziert.

IL-2 Rezeptor exprimierende Lymphozyten

Die Exprimierung des IL-2 Rezeptors wurde als ein Marker zum Nachweis

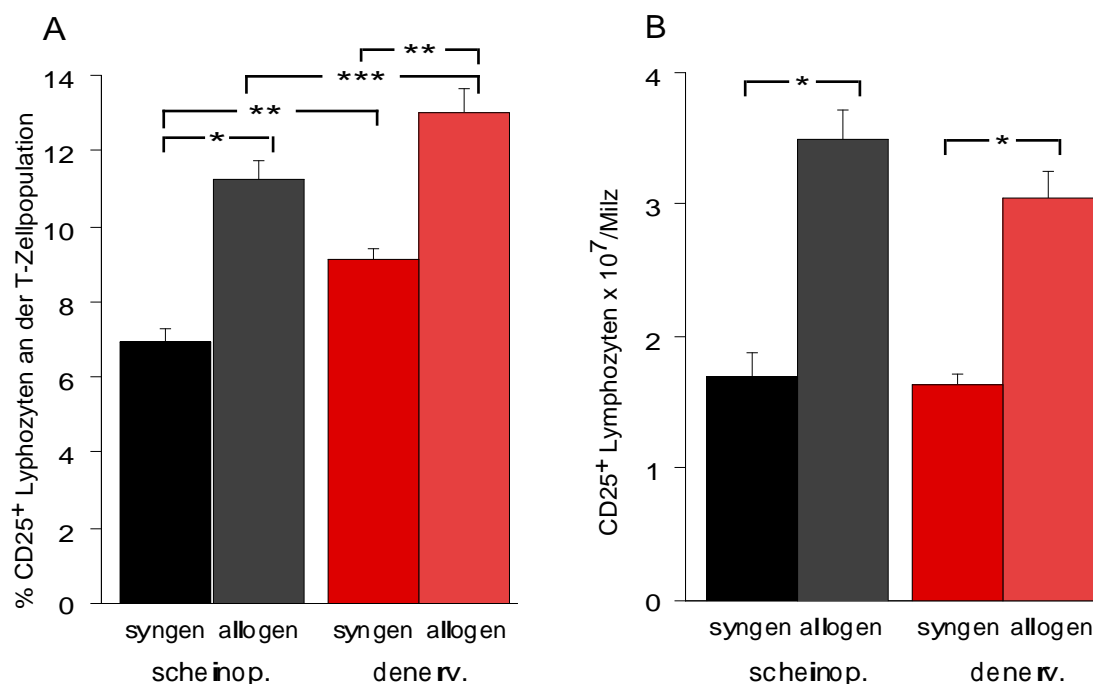


Abb. 5.2-13 % CD25⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute CD25⁺ Lymphozyten (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder in scheinoperierten (scheinop.) Tieren. A: Die Stimulierung des Immunsystems erhöht den prozentualen Anteil CD25⁺ T-Lymphozyten in der Milz signifikant. Auch die Denervierung führt zu einem signifikanten Anstieg der Anteile CD25⁺ T-Zellen. B: Während die GvHR die Zahl CD25⁺ Zellen in der Milz deutlich erhöht, wird die Zellzahl dieser Population nach der Durchtrennung des Milznerven in den immunstimulierten Tieren leicht verringert. * p<0,002; ** p<0,01; *** p<0,05

aktivierter T-Lymphozyten verwendet. Der monoklonale Maus anti-Ratte Antikörper reagiert mit der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf T-Lymphoblasten und dendritischen Zellen des Thymus. Auch für diese Bestimmungen wurden die Zellen mit anti-CD5 doppelt gefärbt. Dementsprechend zeigen die Ergebnisse den prozentualen Anteil IL-2 Rezeptor positiver Zellen an der T-Lymphozyten-Gesamtpopulation.

Der Anteil IL-2 Rezeptor exprimierender Zellen an der Gesamt-T-Lymphozytenpopulation (Abb.5.2-13A) und die absolute Zahl IL-2 Rezeptor exprimierender Zellen (Abb.5.2-13B) in der Milz steigt in den Tieren, denen parentale Zellen injiziert wurden, deutlich an. Während die Denervierung der Milz den Anteil CD25⁺ signifikant erhöht, verändert sie die absolute Zahl IL-2 Rezeptor exprimierender Lymphozyten kaum.

Aktivierte T-Lymphozyten

CD134 wurde als weiterer Marker für die Bestimmung aktivierter T-Lymphozyten benutzt. CD134 gehört zur NGFR/TNFR Superfamilie bestehend unter anderem aus dem TNF-Rezeptor, dem Fas Antigen, CD27 und CD40. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurde der anti-CD134 Antikörper in Kombination mit anti-CD5 verwendet, womit der Anteil CD134 positiver Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation bestimmt worden ist. Da die hier dargestellten Zellen gleichzeitig auch CD5⁺ sind, wurden vorwiegend aktivierte T-Lymphozyten gezählt.

Die Injektion parental Zellen in die Tiere führt in der Milz zu einer signifikanten Zunahme der prozentualen Anteile CD134⁺ Lymphozyten an der Gesamtpopulation der T-Zellen (Abb. 4.2.-14 A) und der absoluten Zahl CD134⁺ Lymphozyten (Abb. 4.2.-14 B). Während die Denervierung *per se* keine Veränderungen in der Population CD134⁺ Lymphozyten in der Milz bewirkt, kommt es in den immunstimulierten Tieren zu einem signifikantem Anstieg im prozentualen Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation CD5⁺ Lymphozyten.

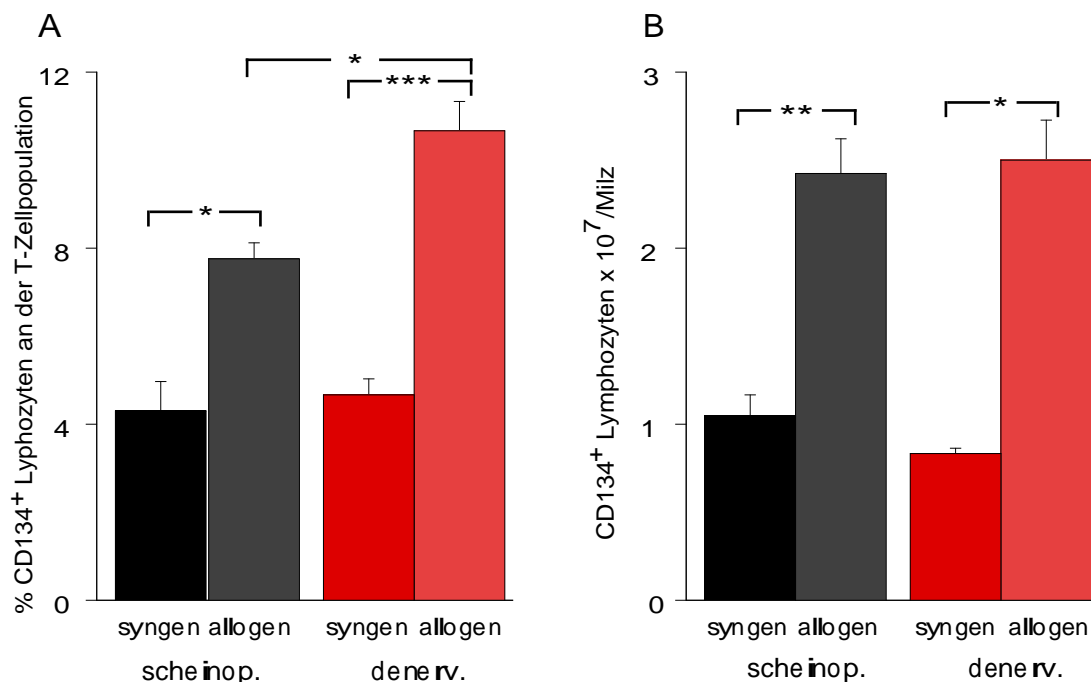


Abb. 5.2-14 % CD134⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute Zahl % CD134⁺ Lymphozyten (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach chirurgischer Milznervdurchtrennung (denerv.) oder in scheinputierten (sche.inop.) Tieren. A: Der Anteil CD134⁺ Zellen an der T-Zellpopulation steigt in den Tieren mit einer GvHR signifikant an. Während die Denervierung in den syngen Tieren *per se* keine Änderungen bewirkt, führt die NA-Reduktion in den stimulierten Tieren (allogen) zu einem signifikanten Anstieg. B: Die GvHR führt zu einer deutlichen Zunahme der absoluten Zahl CD134⁺ Lymphozyten in der Milz. Die Denervierung verändert die Zahl dieser Zellen kaum. * $p < 0,001$; ** $p < 0,003$; *** $p = 0,0001$

Natürliche Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen (NK) der Milz sind mit dem monoklonalen 10/78 Antikörper nachgewiesen worden. Dieser reagiert mit dem NKR-P1A Antigen, das auf NK-Zellen und einer kleinen Subklasse von T-Lymphozyten exprimiert wird, reagiert. Da diese Bestimmung nur in 2 Experimenten durchgeführt wurde ist die Zahl der Versuchstiere sehr klein ($n=2-4$ pro Gruppe).

10 Tage nach Induktion der GvHR wird die absolute Zahl NK-Zellen in der Milz signifikant erhöht (Abb.5.2-15B). Während die Denervierung in der Milz immunstimulierter Tiere die prozentualen Anteile und die absolute Zahl der NK-Zellen nicht verändert, kommt es durch die Reduzierung des NA in den Kontrolltieren zu einem signifikanten Anstieg der Anteile NK-Zellen and der

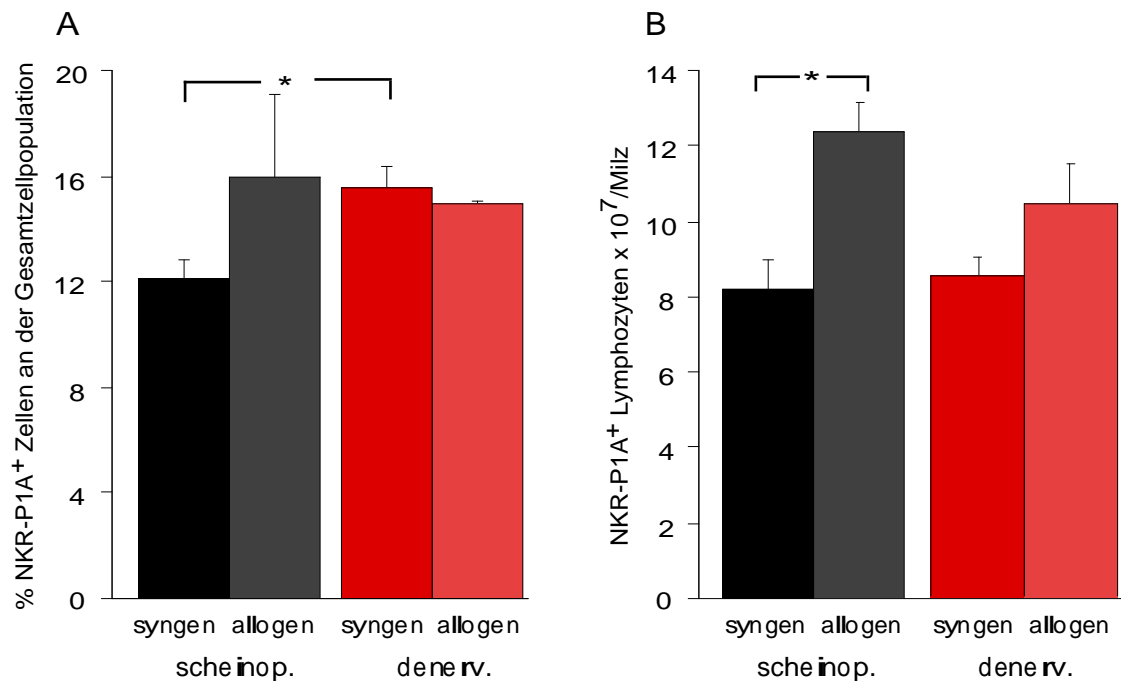


Abb. 5.2-15 % NKR-P1A⁺ Zellen von nukleären Zellen (A) und absolute NKR-P1A⁺ Zahl (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach chirurgischer Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (sche.inop.). A: Die Stimulation der Ratten mit parentalen Zellen führt zu einem marginalen Anstieg der prozentualen Anteile NKR-P1A⁺ Zellen. Die Denervierung *per se* erhöht den Anteil NKR-P1A⁺ Zellen signifikant. B: Während die absolute Zahl NK-Zellen in den Tieren denen parentale Zellen injiziert worden sind signifikant ansteigt, führt die Denervierung in den immunstimulierten Tieren nur zu einem leichten Rückgang dieser Zellen in der Milz. * $p < 0,05$

Gesamtzellpopulation (Abb.5.2-15A)

5.2.3 Zytokingehalt der Milz

Neben der Messung der zellulären Zusammensetzung wurde der Gehalt verschiedener Zytokine in der Milz bestimmt. Die Proteinmengen sind mit kommerziell verfügbaren ELISA-Kits aus Milzhomogenisaten ermittelt. Fünf verschiedene Zytokine wurden gemessen: IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α und IFN- γ . IL-1 β und TNF- α werden von aktivierten Makrophagen sezerniert; IL-2 und IFN- γ werden von Th-1 Zellen sezerniert und IL-10 wird von Th-2 Lymphozyten produziert.

Die von den Zytokinmessungen ermittelten Ergebnisse werden auch als Gehalt pro 1 Million mononukleärer Milzzellen dargestellt. Wie im Abschnitt 5.2.1 gezeigt wurde, führt die Denervierung und die Immunstimulation zu Veränderungen in der Zahl und der relativen Anteile roter und weißer Blutkörperchen in der Milz. Da die Zytokine hauptsächlich die Funktionen weißer Blutkörperchen reguliert, ist die Darstellung als Gehalt der Milz oder als Konzentration in der Milz ungenau, wenn das Milzgewicht durch Veränderungen der roten Pulpa beeinflusst wird. Dieses Problem entsteht nicht, wenn die gemessene Zytokinmenge auf die Zahl mononukleärer Zellen bezogen wird.

Interleukin-1 β

IL-1 β ist zum Zeitpunkt der Organentnahme in den scheinoperierten Tieren durch die Injektion parentaler Lymphozyten nicht verändert (Abb. 5.2-16 A+B; Abb. 5.2-17). Die IL-1 β Konzentration in der Milz wird in den Kontrolltieren auch nicht durch die Milznervdurchtrennung beeinträchtigt. Demgegenüber resultiert die Denervierung der Milz von Tieren die eine GvHR durchmachen, in einer signifikanten Zunahme des IL-1 β .

Interleukin-2

Der Gehalt dieses Zytokins in der Milz verhält sich in den verschiedenen Gruppen ähnlich dem IL-1 β . IL-2 wird in der Milz scheinoperierter Tiere durch

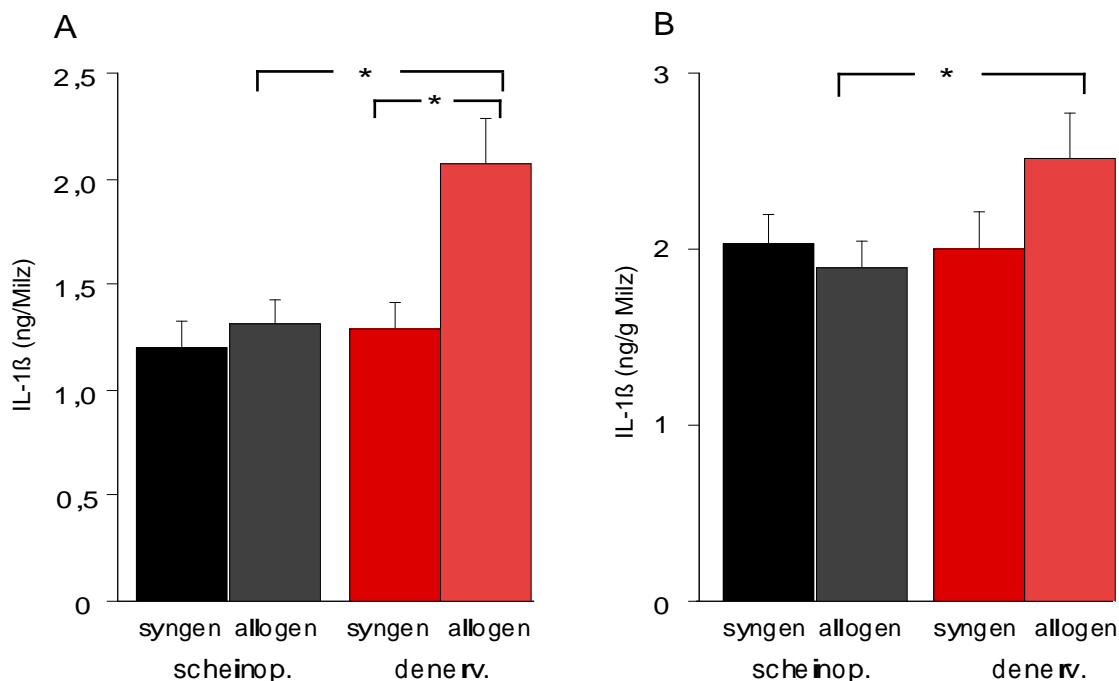


Abb. 5.2-16 IL-1 β Gehalt (A) und IL-1 β Konzentration (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). A: Der IL-1 β Gehalt in der Gesamtmilz ändert sich nach Immunstimulation in den scheinputierten Tieren nicht. Im Gegensatz dazu bewirkt die Denervierung der Milz in den Tieren, denen parentale Zellen injiziert worden sind eine signifikante Zunahme von IL-1 β . B: Die Konzentration von IL-1 β wird ebenfalls nur in den immunstimulierten Tieren mit durchtrenntem Nerv signifikant erhöht. * $p < 0,03$; ** $p < 0,01$.

die Injektion parentaler Zellen leicht erhöht. Im Vergleich dazu kommt es im IL-2 Gehalt und bezogen auf 1×10^6 mononukleäre Zellen in den denervierten

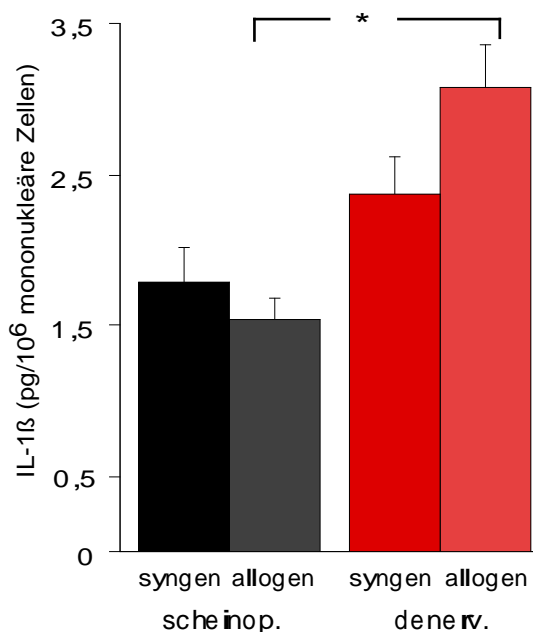


Abb. 5.2-17 IL-1 β bezogen auf 10^6 mononukleäre Zellen in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). Während der IL-1 β Gehalt durch die Immunstimulation nicht verändert wird, kommt es in den denervierten, immunstimulierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg dieses Zytokins. * $p = 0,0001$

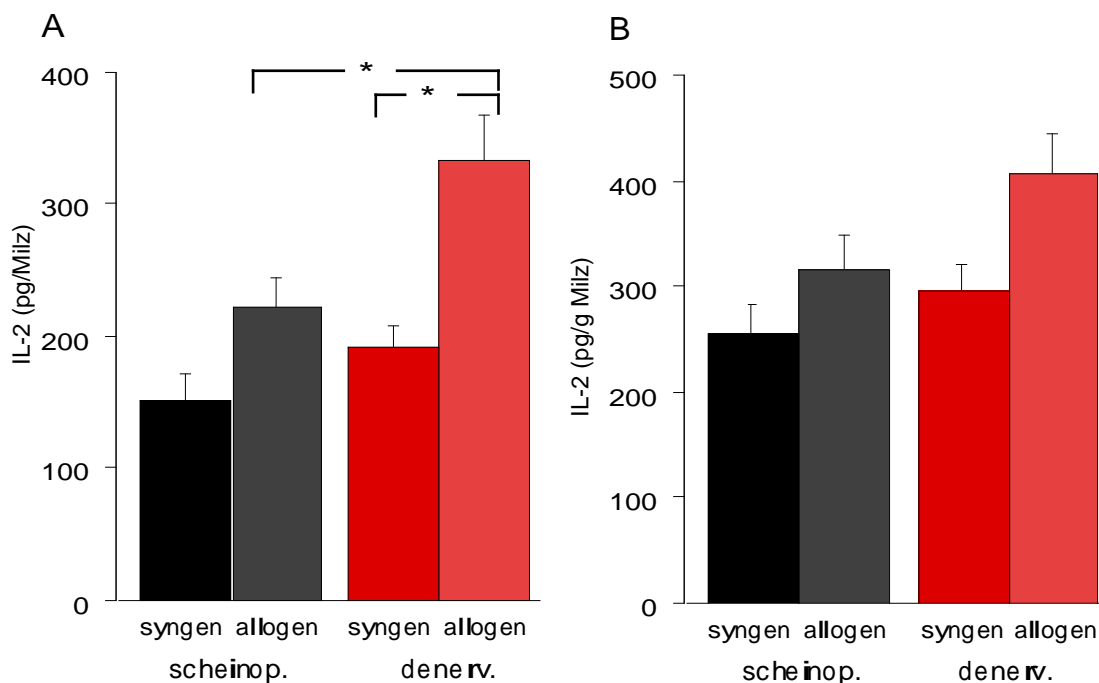


Abb. 5.2.-18 IL-2 Gehalt (A) und IL-2 Konzentration (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). A: Während die Immunstimulation in den innervierten Milzen nur zu einem leichten Ansteigen des IL-2 Gehaltes führt, kommt es in den denervierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg. Die Denervierung selbst erhöht den IL-2 Gehalt in der Milz nur in den Tieren die eine GvHR durchmachen signifikant. B: Die IL-2 Konzentration in der normalen Milz wird durch die GvHR nur leicht erhöht, in den denervierten Tieren führt diese Behandlung zu einer etwas stärkeren Zunahme * $p < 0,03$

Milzen durch die GvHR zu einem deutlichen Anstieg. Während die Denervierung in den Milzen der Kontrolltiere den IL-2 Gehalt pro Zellzahl signifikant erhöht,

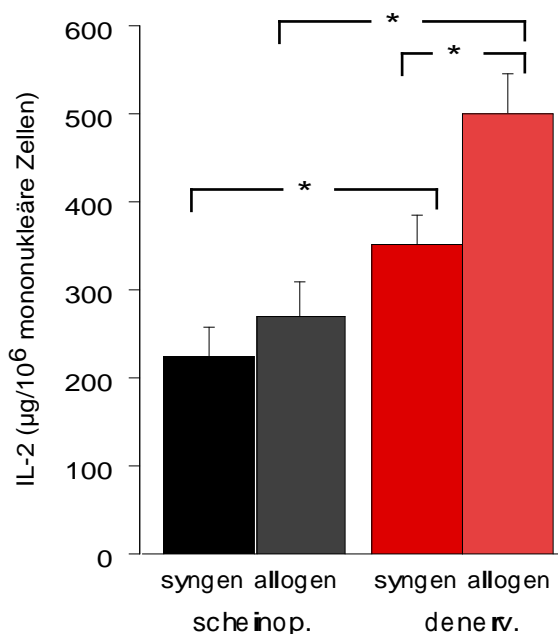


Abb. 5.2-19 IL-2 Gehalt mononukleärer Zellen in Kontrolltieren (syngen) und immunstimulierten (allogen) Tieren mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). Der Gehalt von IL-2 pro nukleäre Zellen ist in der denervierten Milz, in Kontrolltieren und in Tieren denen parentale Zellen injiziert wurden, signifikant erhöht. Zum Zeitpunkt der Organentnahme ist der Zytokingehalt in den Tieren die eine GvHR durchmachen nur in der denervierten Milz signifikant gestiegen. * $p < 0,05$

kommt es in den Tieren, denen parentale Zellen gespritzt worden sind, auch im IL-2 Gehalt der Gesamtmilz zu einem deutlichen Anstieg.

Tumor-Nekrose-Faktor- α

Zu diesem Zeitpunkt der GvHR kommt es in der Milz zu einem deutlichen Anstieg des TNF- α Gehaltes, der TNF- α Konzentration (Abb.5.2-20 A + B) und des Zytokins im Bezug auf 1×10^6 mononukleärer Zellen. Während die Denervierung *per se* in den Kontrolltieren keine Änderung bewirkt, führt die GvHR in den NA-reduzierten Milzen, zu einer signifikanten Zunahme im TNF- α -Gehalt pro Zellzahl (Abb.5.2-21).

Interleukin-10

Von den Zellen in der Milz wird IL-10 in den Tieren mit GvHR verstärkt freigesetzt. Wenngleich die Denervierung alleine den IL-10 Gehalt und die IL-10

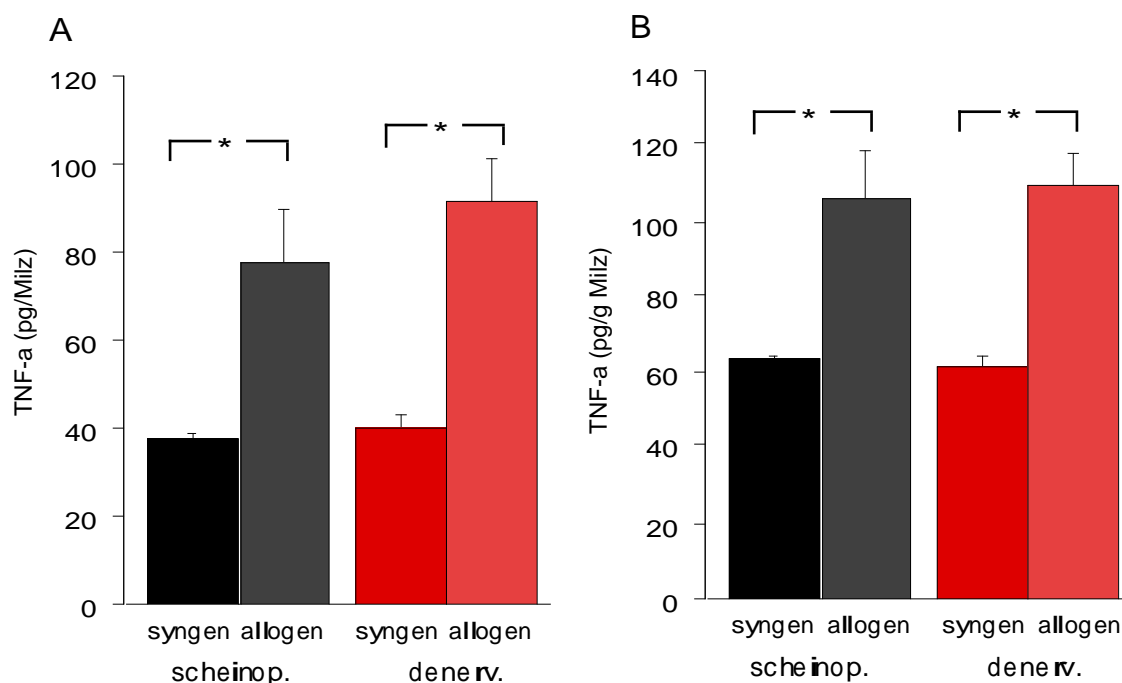


Abb. 5.2-20 TNF- α Gehalt (A) und Konzentration (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). A + B: Die Injektion parentaler Zellen führt zu einem deutlichen Anstieg des TNF- α Gehalts und der Konzentration in der Milz. Die Denervierung verändert weder den TNF- α Gehalt noch die TNF- α Konzentration. * $p < 0,05$

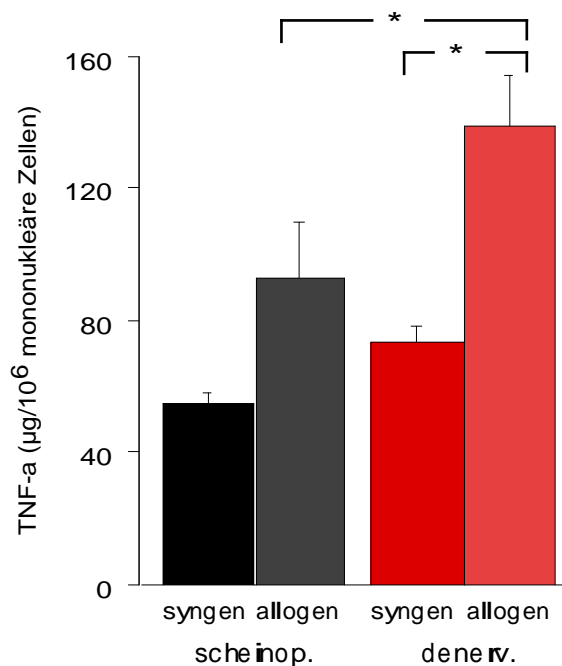


Abb. 5.2-21 TNF- α Gehalt mononukleärer Zellen in Kontrolltieren (syngen) und immunstimulierten Tieren (allogen) mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). Der Gehalt an TNF- α pro mononukleäre Zellen steigt in Tieren, die eine GvHR durchmachten an. Während in den Kontrolltieren die Denervierung der Milz den TNF- α Gehalt kaum verändert, kommt es in den Immunstimulierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg. * $p < 0,05$

Konzentration nicht beeinflusst, bewirkt sie in den Milzen der Tiere, die einer GvHR ausgesetzt sind, eine signifikante Zunahme des Zytokins (Abb.5.2-

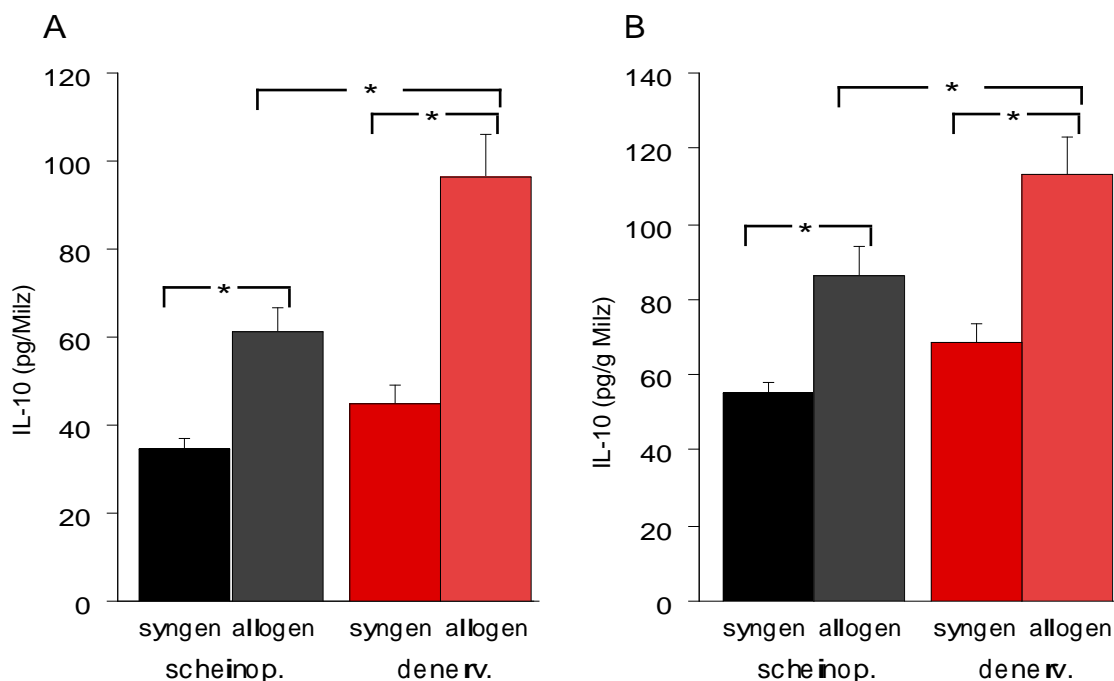


Abb. 5.2-22 IL-10 Gehalt (A) und Konzentration (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). A+B: Die Immunstimulierung führt im Gehalt und in der Konzentration von IL-10 in der Milz zu einem deutlichen Anstieg. Während die Denervierung die Zytokinmenge in den Milzen der Tiere denen parentale Zellen injiziert wurden signifikant erhöht, wird in den Kontrolltieren die IL-10 Produktion durch die Denervierung nicht verändert. * $p < 0,05$

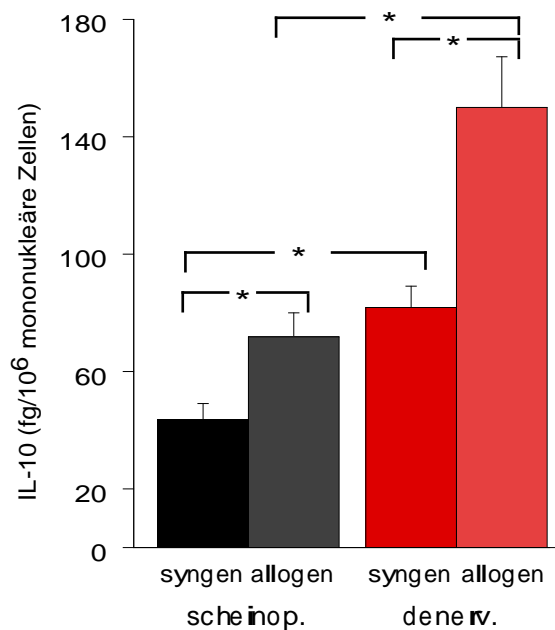


Abb. 5.2-23 IL-10 Gehalt mononukleärer Zellen in Kontrolltieren (syngen) und immunstimulierten Tieren (allogen) mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). Der IL-10 Gehalt pro mononukleäre Zellen ist 10 Tage nach Induktion der GvHR signifikant erhöht. Die Denervierung der Milz führt in den immunstimulierten Tieren und in den Kontrolltieren ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg größer ist. * $p < 0,05$

22A+B). Der Anstieg des IL-10 in dieser Gruppe ist in der Darstellung pro nukleäre Zellen am Deutlichsten ausgeprägt (Abb.5.2-23).

Interferon- γ

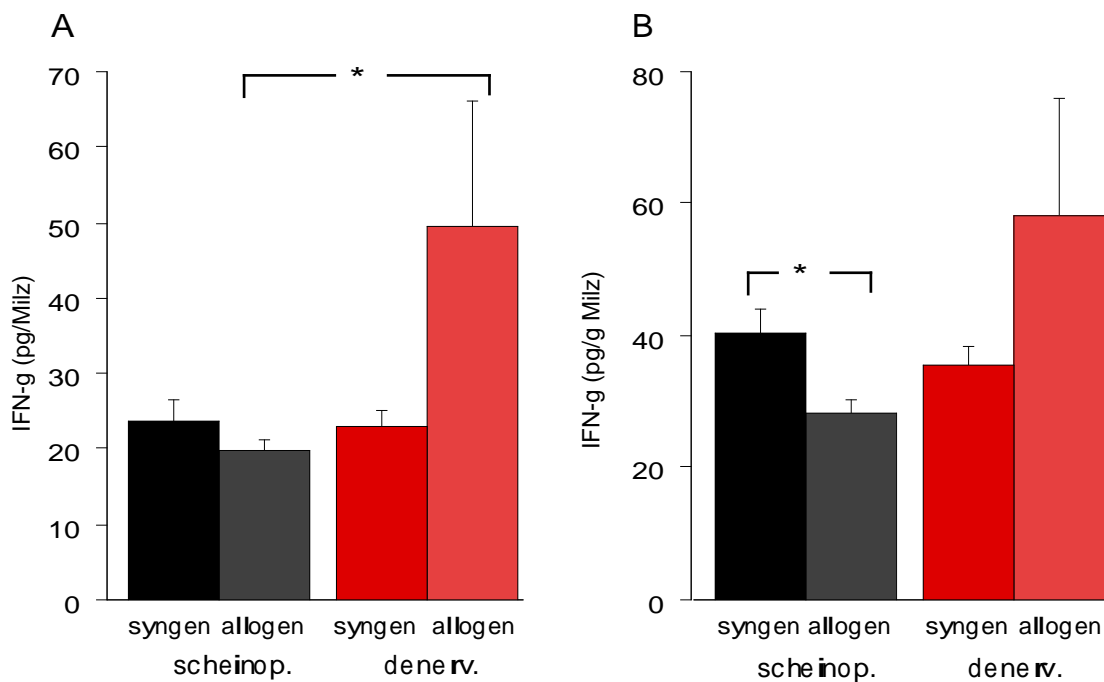


Abb. 5.2-24 IFN- γ Gehalt (A) und Konzentration (B) in der Milz von Tieren die eine GvHR (allogen) durchmachen bzw. in Kontrolltieren (syngen), nach Durchtrennung des Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (scheinop.). A+B: Die Injektion parentaler Zellen reduziert in der GvHR die IFN- γ Konzentration in den scheinoperierten Tieren signifikant. Während die IFN- γ Menge in den Kontrolltieren durch die Denervierung nicht beeinflusst wird, kommt es in den immunstimulierten Tieren zu einem deutlichen Anstieg. * $p < 0,05$

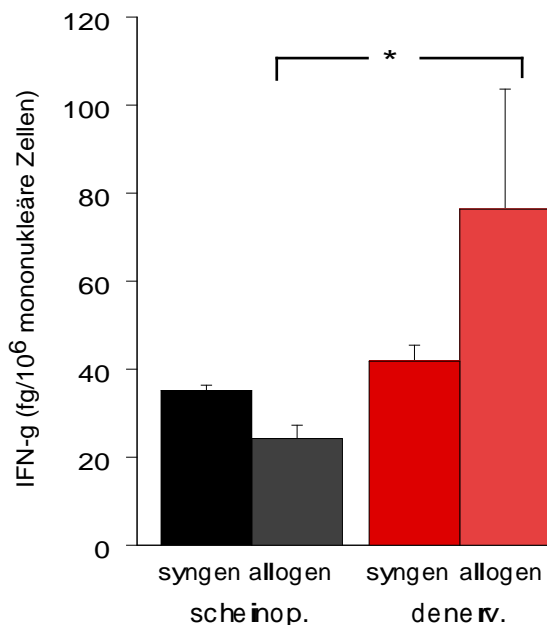


Abb.5.2.-25 IFN- γ Gehalt mononukleärer Zellen in Kontrolltieren (syngen) und immunstimulierten Tieren (allogen) mit chirurgisch durchtrenntem Milznerven (denerv.) oder nach Scheinoperation (sche.inop.). Die Immunreaktion vermindert den IFN- γ Gehalt pro mononukleäre Milzzellen in den scheinooperierten Tieren nur leicht. Demgegenüber führt die Denervierung in der Milz immunstimulierter Tiere zu einem deutlichen Anstieg. * $p < 0,05$

Die Konzentration von IFN- γ sinkt 10 Tage nach der Injektion parentaler Zellen in der Milz scheinooperierter Tiere signifikant ab (Abb. 5.2-24B). Wenngleich die Denervierung *per se* keinen Einfluss auf die basale IFN- γ Produktion in der Milz hat, kommt es in Kombination mit dem Immunstimulus zu einer deutlichen Zunahme der produzierten IFN- γ Menge (Abb. 5.2-24A und-25).

Die hier gezeigten Ergebnisse aus den Versuchen systemischer GvHR und lokaler Denervierung der Milz sind in den folgenden 3 Tabellen schematisch zusammengefasst. Die Ergebnisse sind als prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation (B-, T-Lymphozyten und NK) oder an der T-Zellpopulation (CD4, CD8, IL-2rez und akt. T-Zellen) dargestellt. Zusätzlich sind die absoluten Zellzahlen der jeweiligen Population aufgeführt (z.B. abs. akt. T-Lymphozyten). In der zweiten Spalte sind die gemessenen Zytokine zusammengefasst.

Tabelle 1 zeigt die Effekte der GvHR auf bestimmte Parameter der Milz im Vergleich zu der Bestimmung des selben Parameters in einem Tier, dem syngene Zellen injiziert wurden (z.B. ist der prozentuale Anteil von B-Lymphozyten an der Gesamtzellpopulation in der Milz einer Ratte, der parentale Zellen injiziert wurden, signifikant reduziert verglichen mit dem

prozentualen Anteil dieser Population in der Milz eines Tieres nach syngener Zellinjektion).

Tabelle 2 zeigt die Effekte der Denervierung der Milz von Kontrolltieren auf verschiedene Parameter im Vergleich zu den Bestimmungen der selben Parameter in einer normal innervierten Milz von Tieren, denen ebenfalls syngene Zellen gespritzt wurden (z.B. ist der Anteil der NK Zellen in der denervierten Milz signifikant höher als der Anteil dieser Population in der Milz scheinooperierter Tiere).

Tabelle 3 zeigt die Effekte der Denervierung der Milz die einer GvHR unterliegt auf verschiedene Parameter im Vergleich zu der Bestimmung der selben Parameter in einer normal innervierten Milz, die dem selben Immunstimulus unterliegt (z.B. ist der Anteil aktivierter T-Lymphozyten einer denervierten Milz von Tieren die eine GvHR durchmachen deutlich erhöht verglichen mit dem Anteil dieser Population in einer scheinooperierten Milz, die ebenfalls einer GvHR unterliegt).

Tabelle 1 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung und Zellaktivierung sowie der Zytokinproduktion in der Milz 10 Tage nach allogener Stimulation

Zellzahl	allogen vs syngen	Zytokine	allogen vs syngen
Erythrozyten	↗	IL-1 β pg/g Milz	↔
mononukleäre Milzzellen	↗	pg/Milz	↔
Erythrozyten/Leukozyten	↔	fg/10 ⁶	↔
Zellzusammensetzung		IL-2 pg/g Milz	↔
% B-Lymphozyten	↓	pg/Milz	↗
abs. B-Lymphozyten	↗	fg/10 ⁶	↔
% T-Lymphozyten	↔	TNF-a pg/g Milz	↑
abs. T-Lymphozyten	↗	pg/Milz	↑
% NK+ Zellen	↗	fg/10 ⁶	↗
abs. NK+ Zellen	↑	IL-10 pg/g Milz	↑
% CD4+/T-Lymphozyten	↓	pg/Milz	↑
abs. CD4+ Lymphozyten	↗	fg/10 ⁶	↗
% CD8+/T-Lymphozyten	↑	IFN-g pg/g Milz	↓
abs. CD8+ Lymphozyten	↑	pg/Milz	↔
Aktivierte Zellen		fg/10 ⁶	↘
% IL-2rez+/T-Lymphozyten	↑↑		
abs. IL-2rez+ Lymphozyten	↑↑↑		
akt. T-Zell+/T-Lymphozyten	↑↑		
abs. akt. T-Lymphozyten	↑↑↑		

↑: Zunahme ↓: Abnahme ↑↑: starke Zunahme ↑↑↑: sehr starke Zunahme

↔: keine Änderung ↗: nicht signifikante Zunahme ↘: nicht signifikante Abnahme

Tabelle 2 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung und Zellaktivierung sowie der Zytokinproduktion nach Milzdenervierung in syngenischen Tieren

Zellzahl	denerv. vs scheinop.	Zytokine	denerv. vs scheinop.
Erythrozyten	↗	IL-1β pg/g Milz	↔
mononukleäre Milzzellen	↘	pg/Milz	↔
Index Ery/Leuko	↗	fg/10 ⁶	↗
Zellzusammensetzung		IL-2 pg/g Milz	↔
% B-Lymphozyten	↔	pg/Milz	↔
abs. B-Lymphozyten	↘	fg/10 ⁶	↑
% T-Lymphozyten	↔	TNF-a pg/g Milz	↔
abs. T-Lymphozyten	↘	pg/Milz	↔
% NK+ Zellen	↑	fg/10 ⁶	↗
abs. NK+ Zellen	↔	IL-10 pg/g Milz	↔
% CD4+/T-Lymphozyten	↔	pg/Milz	↔
abs. CD4+ Lymphozyten	↓	fg/10 ⁶	↑
% CD8+/T-Lymphozyten	↔	IFN-g pg/g Milz	↔
abs. CD8+ Lymphozyten	↘	pg/Milz	↔
Aktivierte Zellen		fg/10 ⁶	↔
% IL-2rez+/T-Lymphozyten	↑		
abs. IL-2rez+ Lymphozyten	↔		
akt. T-Zell+/T-Lymphozyten	↔		
abs. akt. T-Lymphozyten.	↔		

↑: Zunahme ↓: Abnahme ↔: keine Änderung ↗: nicht signifikante Zunahme

↘: nicht signifikante Abnahme

Tabelle 3 Veränderungen der Zellzusammensetzung und Zellaktivierung sowie der Zytokinproduktion nach Milzdenervierung in allogenen stimulierten Tieren

Zellzahl	denerv. vs scheinop.	Zytokine	denerv. vs scheinop.
Erythrozyten	↗	IL-1 β pg/g Milz	↑
mononukleäre Milzzellen	↓	pg/Milz	↑
Index Ery/Leuko	↑	fg/10 ⁶	↑↑
Zellzusammensetzung		IL-2 pg/g Milz	↗
% B-Lymphozyten	↔	pg/Milz	↑
abs. B-Lympho	↓	fg/10 ⁶	↑
% T-Lymphozyten	↔	TNF-a pg/g Milz	↔
abs. T-Lymphozyten	↓	pg/Milz	↔
% NK+ Zellen	↔	fg/10 ⁶	↑
abs. NK+ Zellen	↘	IL-10 pg/g Milz	↑
% CD4+/T-Lymphozyten	↔	pg/Milz	↑
abs. CD4+ Lymphozyten	↓	fg/10 ⁶	↑↑
% CD8+/T-Lymphozyten	↔	IFN-g pg/g Milz	↗
abs. CD8+ Lymphozyten	↓	pg/Milz	↗
Aktivierte Zellen		fg/10 ⁶	↑
% IL-2rez+/T-Lymphozyten	↑		
abs. IL-2rez+ Lymphozyten	↘		
% akt. T-Zell+/T-Lympho.	↑↑		
abs. akt. T-Lymphozyten	↔		

↑: Zunahme ↓: Abnahme ↑↑: starke Zunahme ↔: keine Änderung

↗: nicht signifikante Zunahme ↘: nicht signifikante Abnahme

5.3 Lokale Graft versus Host Reaktion

Die Untersuchungen der lokalen GvHR sind am pLK durchgeführt worden. Dazu wurden 1×10^7 LK-Zellen subcutan in die Fußsohle injiziert. Jedes Tier erhielt beidseitig entweder parentale Zellen oder LK-Zellen der (WKYxPVG) F1 Tiere verabreicht. Die Denervierung des LK wurden mit 6-OH-DA durchgeführt. Während die rechte Kniekehle mit Ascorbinsäure (ctrl.) behandelt wurde ist der pLK der linken Körperseite mit 6-OH-DA denerviert worden. Die Gewebe für die Messungen des NA-Gehaltes und der zellulären Zusammensetzung wurden 5 Tage nach Zellinjektion entnommen.

5.3.1 Allgemeine Bestimmungen

Noradrenalin im poplitealen Fettgewebe (pFett)

Die Messung des NA-Gehaltes im pFett dient als Referenz für den NA-Gehalt im pLK, da dieser für die Bestimmungen der zellulären Zusammensetzung benötigt wurde. Die Korrelation der NA-Konzentration in diesen Geweben ist in Kapitel 5.1.4 gezeigt. Der Neurotransmitter im pFett der denervierten Körperseite wird auf weniger als 30 % gegenüber den Kontrollorganen der nicht

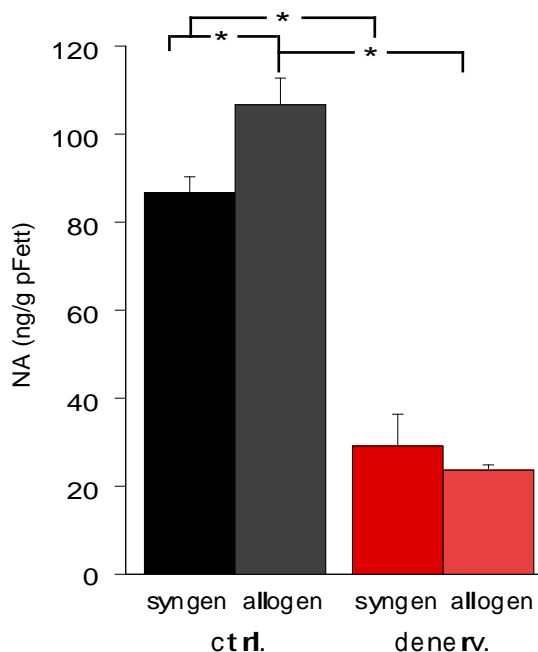


Abb. 5.3-1 NA-Konzentration im pFett von Tieren denen parentale Zellen (allogen) oder syngene Zellen (syngen) injiziert worden ist, nach chemischer Denervierung (denerv.) oder Behandlung mit Ascorbinsäure (ctrl.). Die Denervierung reduziert den NA-Gehalt in dem pFett deutlich. In den Ascorbinsäure behandelten pLK führt die Immunreaktion zu einem signifikanten Anstieg der NA-Konzentration im pFett.
* $p < 0,05$

denervierten Körperseite der Transmittergehalt signifikant erhöht. Aufgrund der Korrelation mit dem NA-Gehalt des pLK, kommt es in diesen Organen während der allogeen Stimulation zu einer Zunahme des Neurotransmitters.

Lymphknotengewicht

Das Gewicht der pLK immunstimulierter Tiere ist zum Zeitpunkt der Organentnahme in den nicht denervierten pLK bis um das Zehnfache gegenüber den Kontroll-pLK erhöht (Abb. 5.3-2, allogen vs syngen). Obwohl in den denervierten pLK der Anstieg auch signifikant ist, nimmt das Gewicht des pLK in den Tieren mit einer GvHR nur ungefähr um das Sechsfache zu.

Mononukleäre Zellzahl im pLK

Die lokale GvHR führt in den pLK zu einer deutlichen Zunahme mononukleärer Zellen (Abb.5.3-3; allogen vs syngen). Ähnlich wie bei dem Organgewicht ist die Zellenzahl im pLK 5 Tage nach Induktion der GvHR etwas reduziert, wenn das Organ vor der Zellinjektion denerviert worden ist. (allogen denerv. vs allogen ctrl.). Die Darstellung beider Parameter in einem Regressionsplot zeigt die Korrelation des Organgewichtes mit der Zellzahl (Abb. 5.3-4). Entgegen den

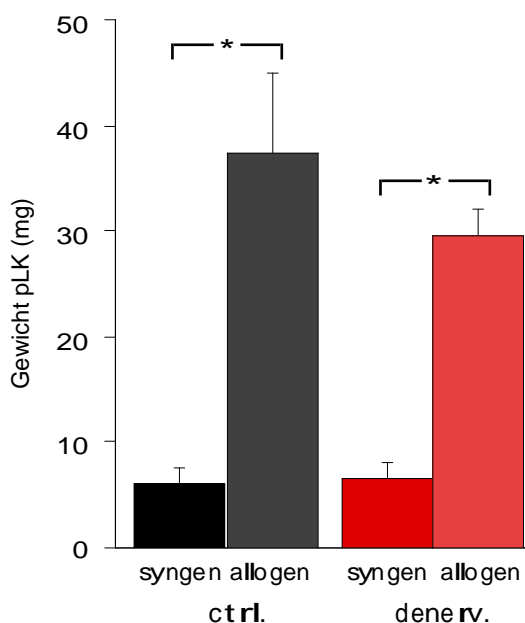


Abb.5.3-2 Gewicht pLK von Tieren denen parentale Zellen (allogen) oder syngene Zellen (syngen) injiziert wurden, nach chemischer Denervierung (denerv.) oder Behandlung mit Ascorbinsäure (ctrl.). Während die Immunstimulation in den innervierten Organen zu einer Zunahme des Organgewichtes um nahezu das 10 Fache führt, kommt es in den denervierten pLK nur zu einer Zunahme des Organgewichtes um ca. das 6 Fache
* $p < 0,05$

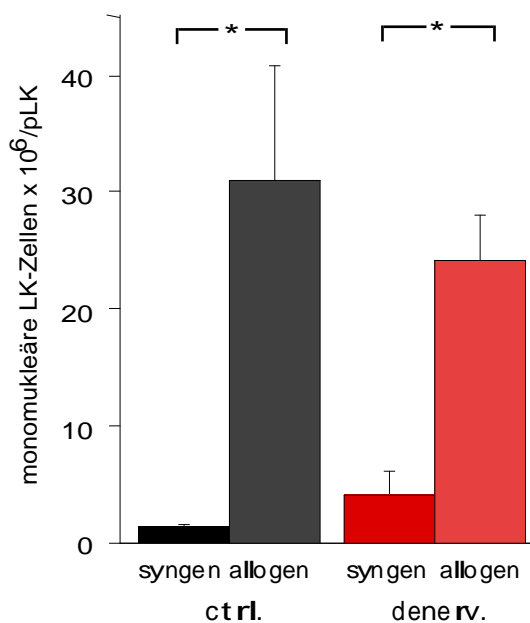


Abb.5.3-3 mononukleäre Zellen im pLK von Tieren denen parentale Zellen (allogen) oder syngene Zellen (syngen) injiziert wurden, nach chemischer Denervierung (denerv.) oder Behandlung mit Ascorbinsäure (ctrl.). Die Injektion parentaler Zellen führt zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl gegenüber den syngen Tieren (allogen vs syngen). Die Zunahme ist in den innervierten pLK größer als in den denervierten. * $p < 0,05$

Verhältnissen in der Milz scheint im pLK das Organgewicht sehr stark von der absoluten Zellzahl im Organ abhängig zu sein.

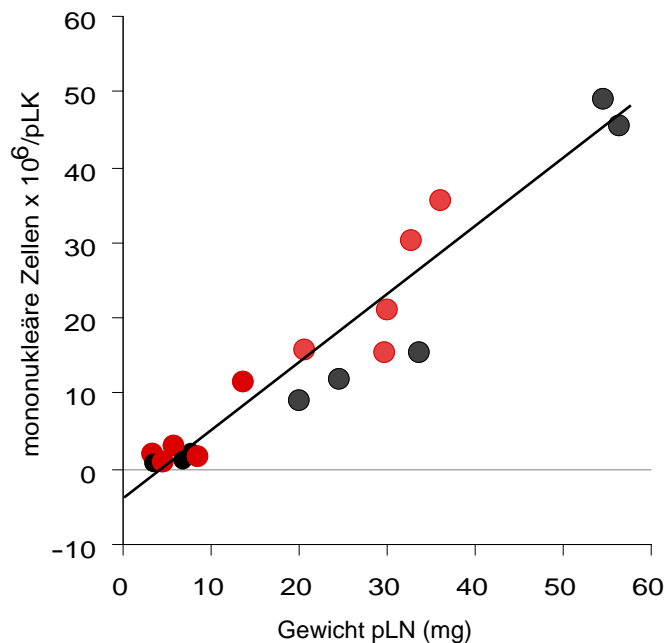


Abb. 5.3-4: Positive Korrelation zwischen der Zahl mononukleärer Zellen und dem Organgewicht in den denervierten pLK nach Injektion parentaler Zellen (○) oder syngener Zellen (●) und in den innervierten pLK nach Injektion parentaler Zellen (○) oder syngener Zellen (●). $r = 0,956$ $p < 0,0001$

5.3.2 Zelluläre Zusammensetzung im poplitealen Lymphknoten

Die zelluläre Zusammensetzung im pLK wurde mit der Durchflußzytometrie gemessen. Die Antikörper zur Phenotypisierung entsprechen denen für die Messungen der zellulären Zusammensetzung in der Milz. Zu den Bindungseigenschaften dieser Antikörper siehe Kapitel 5.2.2. Die pLK der Tiere sind 3 Tage vor Beginn der Zelinjektion mit 6-OH-DA bzw. Ascorbinsäure behandelt worden. Fünf Tage nach Induzierung der Zellen wurden den Tieren die zu untersuchenden Organe entnommen.

B-Lymphozyten

In normal innervierten pLK ist der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten an

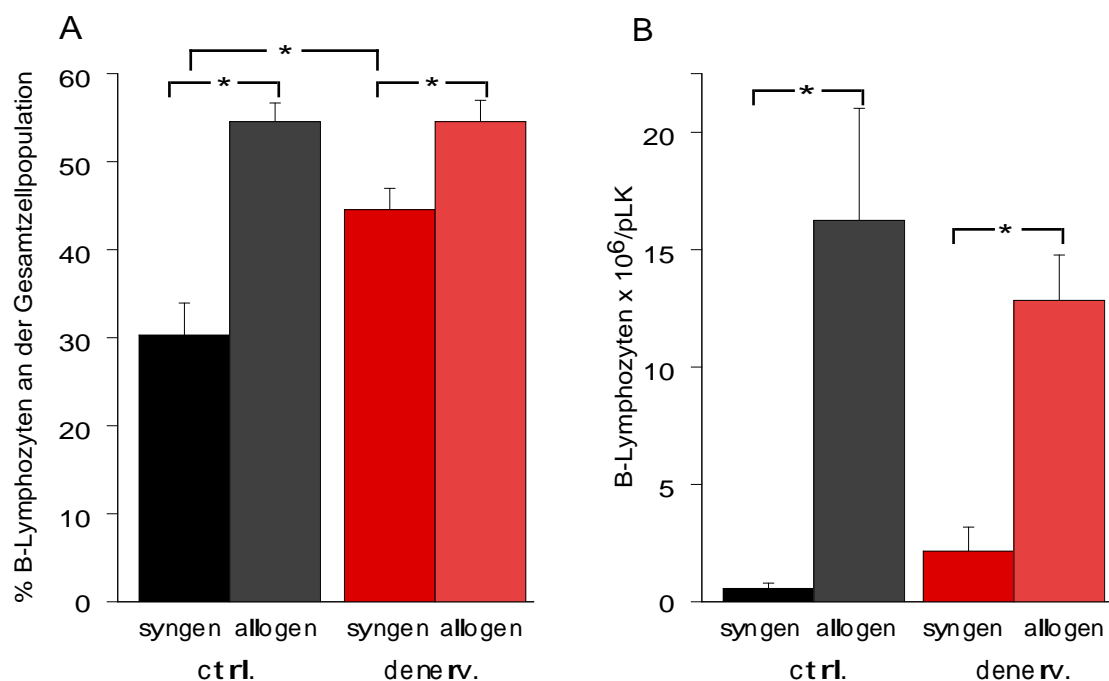


Abb.5.3-5 % B-Lymphozyten (A) und absolute B-Lymphozytenzahl (B) im pLK von Tieren nach parentaler (allogen) oder syngener (syngen) Zelinjektion, in denervierten (denerv.) oder normal innervierten (ctrl.) pLK. A: Die GvHR führt im normal innervierten pLK zu einer signifikanten Zunahme der B-Zellanteile. In den denervierten pLK ist der Anstieg wesentlich geringer. Während die Denervierung des LK in den mit syngen Zellen behandelten Tieren zu einem deutlichen Anstieg der B-Zellanteile führt, wird in den immunstimulierten Tieren diese Zellpopulation nicht weiter erhöht. B: Entsprechend der prozentualen Zunahme der B-Zellen wird in den immunstimulierten Tieren die absolute B-Lymphozytenzahl deutlich größer. Die Denervierung führt zu einer leichten Reduzierung der B-Lymphozytenzahl in den immunstimulierten Tieren. * $p < 0,05$

der Gesamtpopulation 5 Tage nach Induzierung der GvHR signifikant erhöht (Abb.5.3-5A). Die Denervierung *per se* erhöht den Anteil dieser Zellen in den pLK, die keiner Immunantwort unterliegen, signifikant gegenüber den innervierten pLK. Im Gegensatz dazu ist in den immunstimulierten Tieren der Prozentsatz an B-Lymphozyten in den innervierten und den denervierten pLK gleich. Es ist daher zu bemerken, dass die relative Zunahme der B-Zellpopulation nach Immunstimulation in den denervierten pLK wesentlich geringer ist (nur 30 %) als in den pLK die normal innerviert sind (um 80 %).

Der Anstieg der absoluten B-Lymphozytenzahl (Abb. 5.3-5B) ist während der GvHR noch deutlicher. In dieser Darstellung führt die Denervierung des pLK zu einer leichten Abnahme der B-Lymphozytenzahl, wenn das Tier eine GvHR

T-Lymphozyten

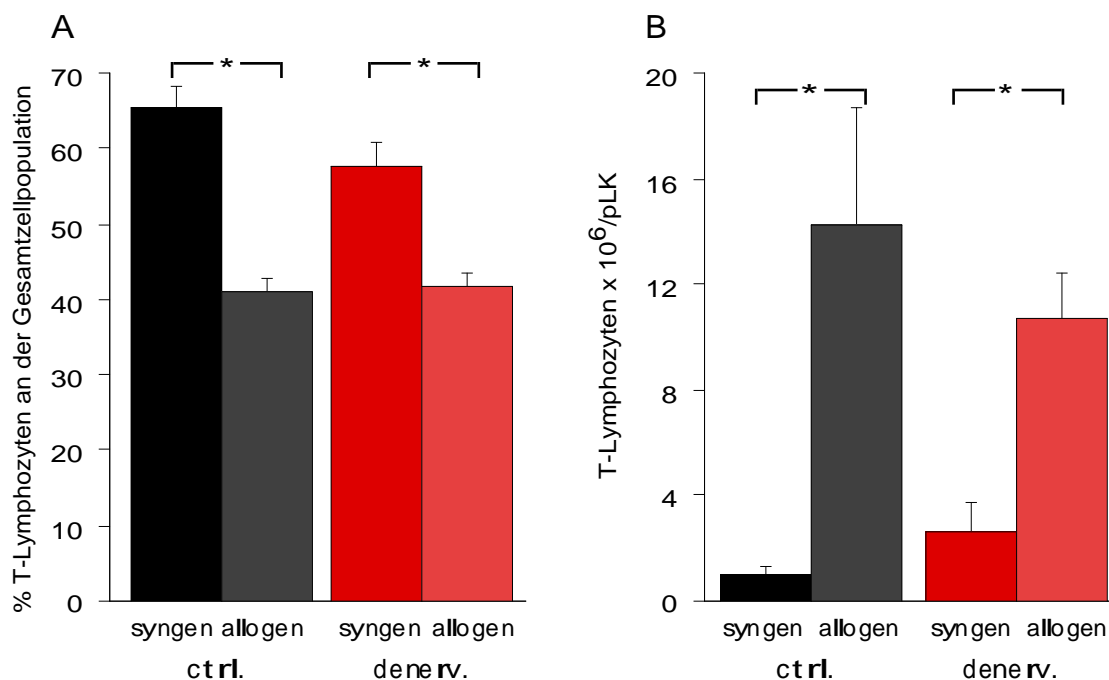


Abb.5.3-6 % T-Lymphozyten (A) und absolute T-Lymphozytenzahl (B) im pLK von Tieren nach parentaler (allogen) oder syngener (syngen) Zellinjektion, in denervierten (denerv.) oder normal innervierten (ctrl.) pLK. A: Die GvHR führt zu einer deutlichen Abnahme der T-Lymphozytenanteile (allogen vs syngen). Während die Denervierung die T-Zellpopulation in den immunstimulierten Tieren nicht verändert, kommt es nach Injektion syngener Zellen durch die Denervierung zu einer leichten Abnahme der Anteile dieser Population. B: Die Immunstimulation erhöht die Zahl CD5⁺ Zellen sehr stark. Die Denervierung jedoch scheint in den Tieren mit einer lokalen GvHR die Zahl der T-Lymphozyten etwas zu verringern. * p<0,05

durchmacht.

Die GvHR bewirkt eine deutliche Reduzierung der Anteile der T-Lymphozyten im pLK (Abb.5.3-6A). Die Denervierung scheint die prozentualen Anteile der T-Lymphozytenpopulation im pLK weder nach Injektion syngener Zellen signifikant zu verändern noch nach Induzierung einer GvHR. Die absolute Zahl der T-Lymphozyten ist im pLK nach parentaler Zellinjektion deutlich erhöht (Abb.5.3-6B). Andererseits wird die Zahl der T-Lymphozyten während der GvHR leicht reduziert, wenn der pLK vor der Immunstimulierung denerviert wurde.

CD4⁺ Lymphozyten

Im pLK kommt es nach Injektion allogener Zellen in die Fußsohle zu einer

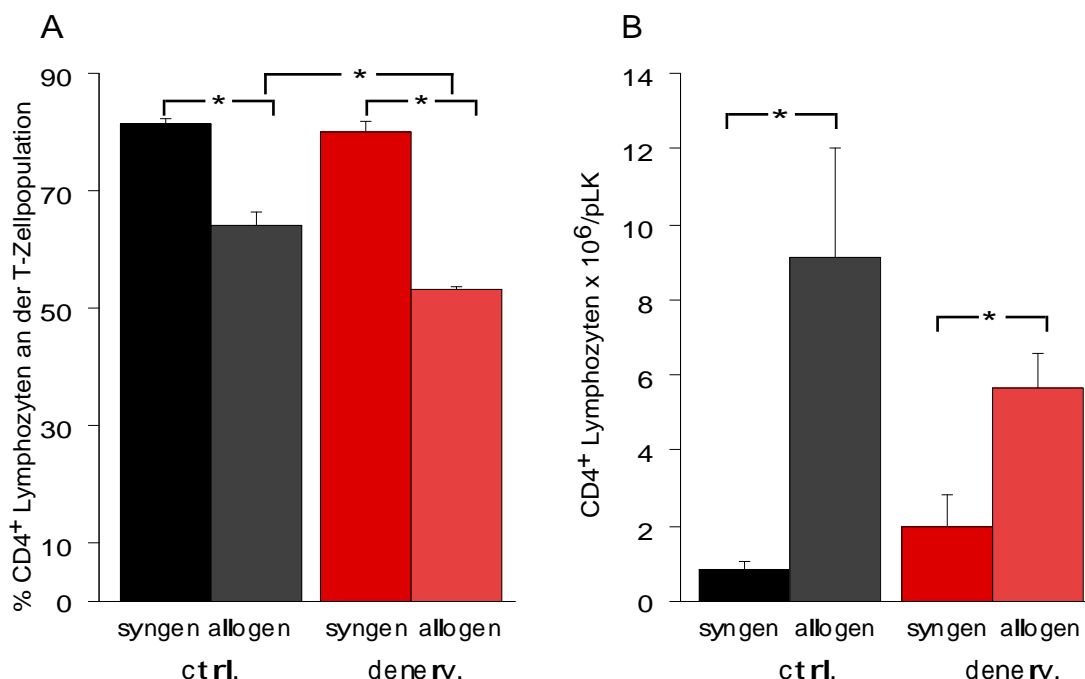


Abb.5.3-7 % CD4⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute Zahl CD4⁺ Lymphozyten (B) im pLK von Tieren nach parentaler (allogen) oder syngener (syngen) Zellinjektion, in denervierten (denerv.) oder normal innervierten (ctrl.) pLK. A: Die GvHR führt zu einer signifikanten Abnahme der CD4⁺ Population im pLK verglichen mit den pLK von Tieren denen syngene Zellen gespritzt wurden. In den immunstimulierten Tieren kommt es in den denervierten pLK zu einer signifikanten Reduzierung der CD4⁺ Zellanteile. B: Während die Injektion parentaler Zellen einen enormen Anstieg der Zahl CD4⁺-Zellen verursacht, kommt es in diesen Tieren in den denervierten pLK zu einer sichtbaren Reduzierung der Zahl CD4⁺ Zellen. * p<0,05

signifikanten Reduzierung der Anteile $CD4^+$ Zellen in der T-Zellpopulation. Während die Denervierung des LK in den unstimulierten Tieren die Anteile der $CD4$ Population nicht verändert, führt die Abnahme der NA-Konzentration zu einer signifikanten Verminderung dieser Subpopulation im immunstimulierten pLK (Abb.5.3-7A). Da es während der GvHR zu einem massiven Anstieg der Zellzahl kommt, steigt die absolute Zahl $CD4^+$ Zellen im pLK der immunstimulierten Tiere gegenüber den unstimulierten Ratten deutlich an (Abb.5.3-7B). In einem nicht so starkem Ausmaß wie in den prozentualen Anteilen wird auch die absolute Zahl $CD4^+$ Lymphozyten in den Tieren mit parentaler Zellinjektion durch die Denervierung vermindert.

$CD8^+$ Lymphozyten

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass der relative Anteil $CD8^+$ Lymphozyten um nahezu das Doppelte ansteigt (Abb.5.3-8A) und die absolute Zellzahl dieser Subpopulation um mehr als das Fünffache zunimmt

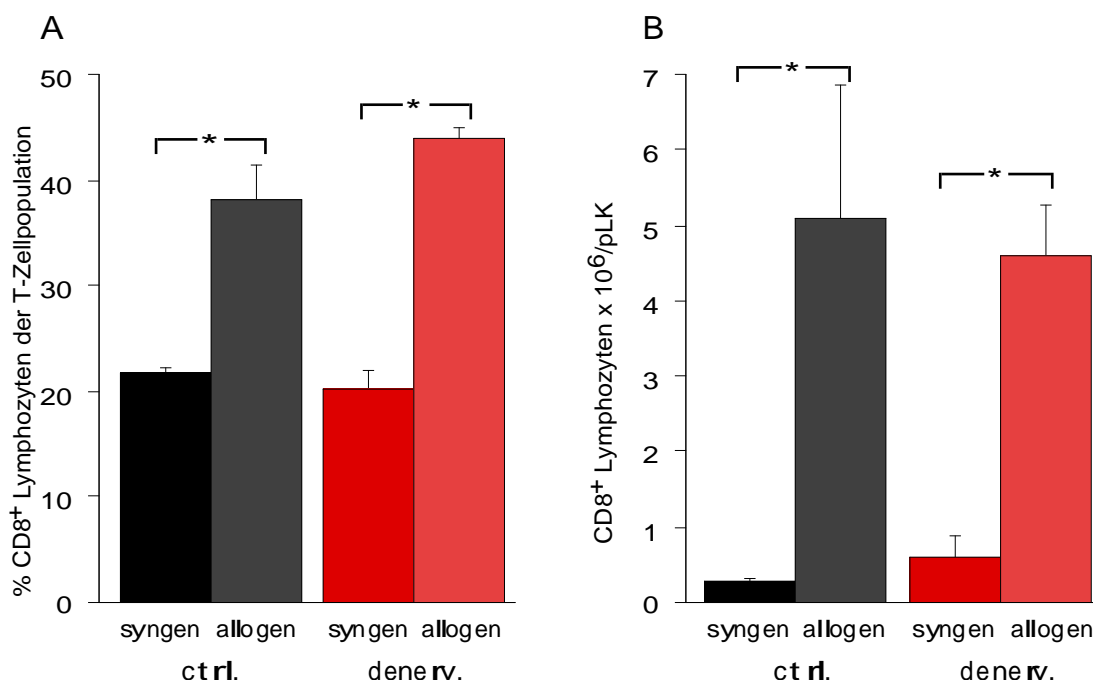


Abb.5.3-8 % $CD8^+$ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute Zahl $CD8^+$ Lymphozyten (B) im pLK von Tieren nach parentaler (allogen) oder syngener (syngen) Zellinjektion, in denervierten (denerv.) oder normal innervierten (ctrl.) pLK. A+B: Während die GvHR den Anteil der $CD8^+$ Zellen an der T-Zellpopulation (A) und die absolute Zahl dieser Zellen (B) im pLK deutlich erhöht, kommt es zu keiner sichtbaren Veränderung durch die Denervierung. * $p < 0,05$

(Abb.5.3-8B), wenn in einem normalen pLK eine GvHR stattfindet. Die Denervierung des pLK scheint keine deutlichen Veränderungen hervorzurufen, wenngleich die absolute Zahl CD8⁺ Lymphozyten in einem denervierten LK während der GvHR abzunehmen scheint.

CD25⁺ Zellen

Ähnlich den Ergebnissen aus den Messungen CD8⁺ Lymphozyten kommt es während der GvHR im pLK zu einer deutlichen Zunahme der prozentualen Anteile IL2rez⁺ (CD25⁺) Zellen an der T-Lymphozytenpopulation (Abb. 5.3-9A) und der absoluten Zahl dieser Lymphozyten (Abb.5.3-9B). Demgegenüber beeinflusst die Denervierung die CD25⁺ Zellen weder im pLK der mit syngen Zellen injizierten Tiere noch verändert es diese Population merklich in Tieren mit

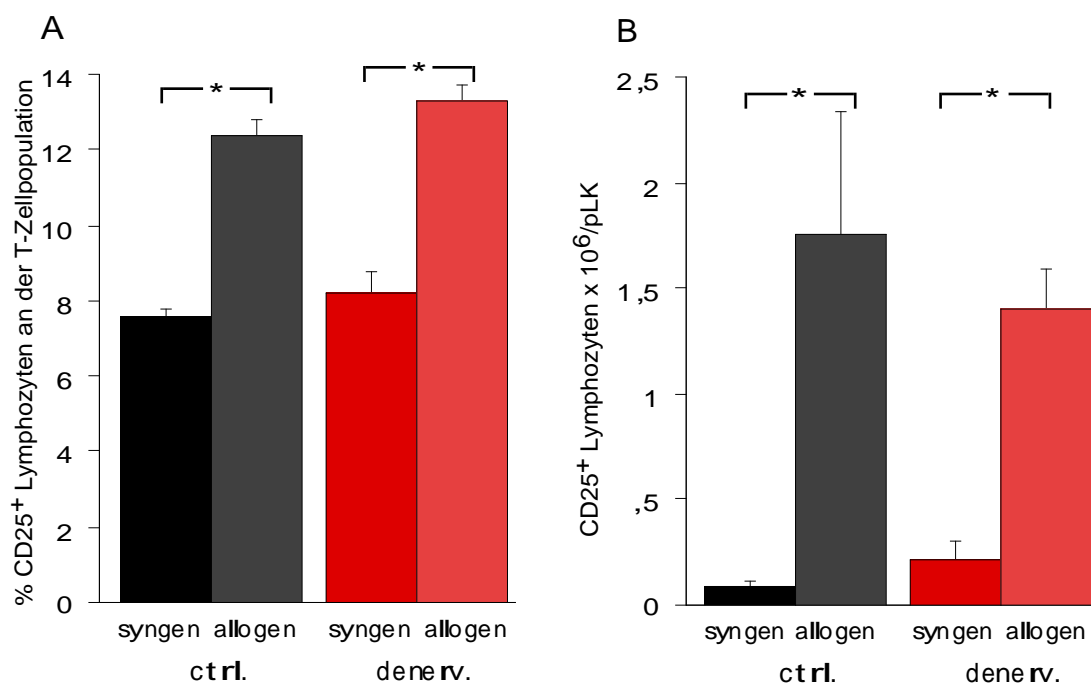


Abb.5.3-9 % CD25⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute Zahl CD25⁺ Lymphozyten (B) im pLK von Tieren nach parentaler (allogen) oder syngener (syngen) Zellinjektion, in denervierten (denerv.) oder normal innervierten (ctrl.) pLK. A+B: Die GvHR führt 5 Tage nach Injektion parentaler Zellen im pLK zu einer signifikanten Zunahme der relativen Anteile an der T-Lymphozytenpopulation und der absoluten Zahl CD25⁺ Lymphozyten. Obwohl die Denervierung keine eindeutigen Veränderungen dieser Population bewirkt, scheint die absolute Zahl dieser Zellen in den immunstimulierten Tieren nach Zerstörung der noradrenergen Nervenfasern leicht reduziert zu sein. * $p < 0,05$

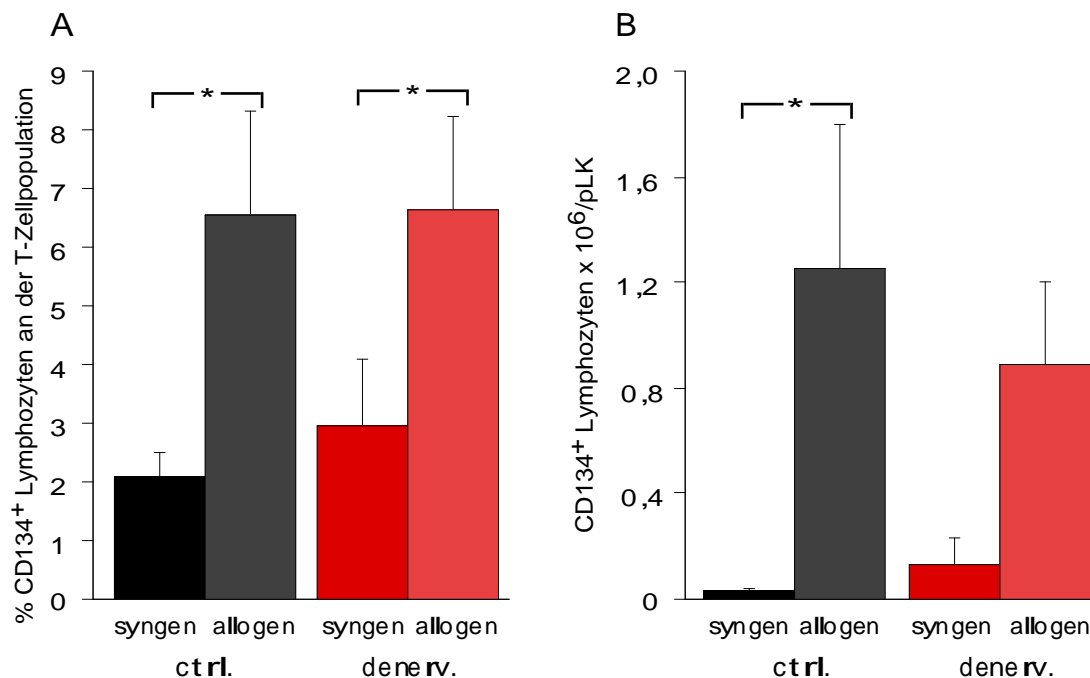


Abb.5.3-10 % CD134⁺ Lymphozyten an der T-Zellpopulation (A) und absolute Zahl CD134⁺ Lymphozyten (B) im pLK von Tieren nach parentaler (allogen) oder syngener (syngen) Zellinjektion, in denervierten (denerv.) oder normal innervierten (ctrl.) pLK. A+B: Die GvHR erhöht die Anteile und die absolute Zahl CD134⁺ T-Lymphozyten im pLK signifikant. Obwohl die Denervierung keine offensichtliche Änderungen dieser Population bewirkt, kommt es in den NA-reduzierten LK nach Immunstimulierung zu einer leichten Abnahme der Zahl aktivierter T-Lymphozyten. * p<0,05

einer GvHR, selbst wenn die absolute Zahl dieser Zellen im LK während einer GvHR durch die Denervierung leicht abnimmt.

CD134⁺ Lymphozyten (aktivierte T-Lymphozyten)

Ähnlich der Veränderungen der IL-2rez⁺ Population wird auch der Anteil aktivierter T-Lymphozyten nach allogener Stimulation signifikant erhöht (Abb.5.3-10A). Dieser deutliche Anstieg beträgt ca. 300%. Die Denervierung verändert den Anteil dieser Zellen weder in den Kontrolltieren (syngen) noch in den allogenen Tieren. Bei der Berechnung der absoluten Zahl aktivierter Lymphozyten im pLK ist der Anstieg durch die GvHR noch deutlicher dargestellt (Abb.5.3-10B). Die Zahl CD134⁺ Lymphozyten während der Immunreaktion reduziert sich etwas, wenn der pLK denerviert ist.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse der Untersuchungen lokaler, neuro-immunologischer Interaktionen im pLK 5 Tage nach Injektion parentaler oder syngener LK-Zellen sind in Tabelle 4 schematisch zusammengefasst. Die Ergebnisse sind als prozentuale Anteile der Gesamtpopulation (B- und T-Lymphozyten, NK) oder an der T-Zellpopulation (CD4, CD8, IL-2rez, akt. T-Lymphozyten) dargestellt. Zusätzlich sind die absoluten Zellzahlen der verschiedenen Populationen aufgeführt (z.B. abs. akt.T-Lymphozyten).

Die Veränderungen in der relativen Zusammensetzung der Subpopulationen und die Veränderungen der absoluten Zellzahl durch die GvHR sind in Spalte 1 dargestellt. Die Spalte 2 zeigt die Veränderungen, die durch die Denervierung des pLK hervorgerufen werden, in Tieren denen syngene Zellen injiziert wurden. In der Spalte 3 sind schließlich die Veränderungen gezeigt, die durch die Denervierung im pLK immunstimulierter Tiere erzeugt werden.

Tabelle 4 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung und Zellaktivierung nach Denervierung des pLK

	1 ctrl.	2 syngen	3 allogen
	allogen. vs	denerv. vs	denerv. vs ctrl.
LK Gewicht	↑↑↑	↔	↘
mononukleäre LK-Zellen	↑↑↑	↗	↘
Zellzusammensetzung			
% B-Lymphozyten	↑	↑	↔
abs. B-Lympho	↑↑↑	↗	↘
% T-Lymphozyten	↓	↘	↔
abs. T-Lymphozyten	↑↑↑	↗	↘
% CD4+/ T-Lymphozyten	↓	↔	↓
abs. CD4+ Lymphozyten	↑↑↑	↗	↘
% CD8+/ T-Lymphozyten	↑	↔	↗
abs. CD8+ Lymphozyten	↑↑↑	↔	↔
Aktivierte Zellen			
% IL-2rez+/T-Zellen	↑	↔	↔
abs. IL-2rez+ Lymphozyten	↑↑↑	↗	↘
% akt. T-Zell+/ T-Lymphozyten	↑	↔	↔
abs. akt. T-Lymphozyten	↑↑↑	↗	↘

↑: Zunahme ↓: Abnahme ↑↑: starke Zunahme ↑↑↑: sehr starke Zunahme

↔: keine Änderung ↗: nicht signifikante Zunahme ↘: nicht signifikante Abnahme

6. Diskussion

Um zu verstehen wie das Immunsystem *in vivo* funktioniert, muss man wissen, wie dieses System durch die wichtigsten physiologischen, regulativ wirksamen Substanzen kontrolliert wird. Inzwischen gibt es viele Hinweise darauf, dass neuro-endokrine Mechanismen zur Immunregulation beitragen. Die Vielfalt verschiedener Arten von Immunantworten und die verschiedenen darin involvierten Zellen und Moleküle machen es notwendig, dass die regulativen Interaktionen während bestimmter Immunantworten untersucht werden. Die hier beschriebenen Studien fokussieren besonders auf die Relevanz des sympathischen Nervensystems zur Kontrolle von Immunantworten auf einen allogenen Stimulus.

6.1. Denervierung

Der Einfluss der noradrenergen Innervation auf das Immunsystem kann untersucht werden, indem das sympathische Nervensystem aktiviert oder gehemmt wird. Letzteres erreicht man durch chemische Zerstörung peripherer Nervenfasern mit 6-OH-DA oder durch chirurgische Durchtrennung der lokalen Innervation eines lymphatischen Organs. Beide Möglichkeiten der Hemmung werden in diesem Kapitel diskutiert.

Zu Beginn wurden vergleichende Studien der basalen NA-Konzentration der Milz in verschiedenen Rattenstämmen durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Vergleichsstudien wurde der WKY-Stamm als Versuchstier ausgewählt, da diese Tiere zum einen als Inzuchtstamm für die Züchtung der F1 Hybriden geeignet sind und andererseits NA in der Milz homogener verteilt ist als in den anderen untersuchten Stämmen.

6.1.1. Chemische Sympathektomie im Vergleich zur chirurgischen Durchtrennung des Milznerven

Die systemische Zerstörung der peripheren noradrenergen Fasern resultiert in einer Abnahme des NA-Gehaltes in weiten Teilen des Organismus (Finch, Haeusler und Thoenen, 1973a). Selbst die Beeinträchtigung zentraler Regelzentren im Hypothalamus kann nicht ausgeschlossen werden, seit eine Abnahme der NA-Menge im Gehirn nach intraperitonealer Behandlung mit 6-OH-DA bei Geburt gemessen werden konnte (Finch, Haeusler und Thoenen, 1973a). Darüber hinaus kann nicht beurteilt werden, in wie weit die Ratte den Innervationsmangel während der körperlichen Entwicklung durch andere Mechanismen kompensiert. Das chromaffine Gewebe der Nebennieren in systemisch denervierten Tieren steigert z.B. die Synthese und Freisetzung von Catecholaminen, wodurch der Anteil dieser Substanzen im Blut erhöht wird. Diese Modifikationen beeinflussen ihrerseits Immunantworten (Besedovsky et al., 1979). Um diese Beeinträchtigungen zu umgehen, wurde für die Experimente mit der GvHR der Milznerv chirurgisch durchtrennt. Das Ausmaß der NA-Reduktion mit dieser Methode ist vergleichbar der chemischen Denervierung bei Geburt. Während in der adulten Ratte einige Wochen nach intravenöser Behandlung mit 6-OH-DA die Reinnervation lymphatischer Organe beobachtet wurde (Finch et al., 1973b, Lorton et al., 1990), ist der NA-Gehalt in der Milz nach chirurgischer Sympathektomie zumindest 28 Tage post operativ unverändert erniedrigt (Vorversuchsdaten nicht gezeigt).

Dennoch sind folgende Aspekte der chirurgischen Milznervdurchtrennung kritisch zu betrachten: Zum einen ist die Gefahr der Infektion während der Operation durch pathogene Keime aus der Umgebungsluft vorhanden. Wenngleich entsprechende Kontrolltiere (Scheinoperation) mitgeführt werden, muss dieser Punkt in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Zweitens kann die lokale Denervierung der Milz auf die Regulation anderer Systeme, z.B. des Kreislaufs Einfluss nehmen, da die Abnahme der

Milzinnervation den Anteil am Herz-Zeitvolumen in diesem Organ erhöht.

Die Vorteile der chirurgischen Milzsympathektomie gegenüber der systemischen Zerstörung des noradrenergen Systems für diesen Arbeitsansatz sind überzeugend. Außerdem kann mit dieser Technik die Interpretation der Versuchsergebnisse präziser auf die Milz bezogen werden und ermöglicht einen besseren Vergleich mit der GvHR am lokal denervierten Lymphknoten. Die Problematik der kompensatorischen Mechanismen oder der Beeinflussung dritter Systeme, die wiederum auf das Immunsystem rückwirken, können bei der lokalen Denervierung weitestgehend ausgeschlossen werden.

6.1.2. Lokale Sympathektomie des poplitealen Lymphknotens

In dieser Arbeit wurden neuroimmunologische Wechselwirkungen während einer GvHR in der lokal denervierten Milz untersucht. Vergleichende Studien sind am pLK durchgeführt worden, da die anatomische Lage dieses Organs optimale Voraussetzungen für eine lokalen Denervierung bietet. Dadurch besteht die Möglichkeit, die auf den pLK begrenzten ersten Schritte einer lokalen Immunantwort unter dem Einfluss des NA-Mangels zu untersuchen. Bei der in der Literatur beschriebenen Denervierungstechnik (Madden et al., 1995; Lorton et al., 1996; Lorton et al., 1999) wird nach operativer Freilegung des pLK 6-OH-DA in das umgebene Fettgewebe injiziert. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals eine nichtinvasive Technik zur lokalen Zerstörung sympathischer Fasern mit 6-OH-DA vorgestellt, bei der eine Reduzierung des NA-Gehalts ähnlich wie bei Madden et al. (Madden et al., 1995) und Lorton et al. (Lorton et al., 1999) beschrieben, erreicht wird. Im Gegensatz zu der von diesen Gruppen beschriebenen Methode werden mit der neuen Technik die afferenten und efferenten Lymphbahnen sowie die Blutgefäße nicht durch eine Operation beschädigt. Die funktionelle Beeinträchtigung des LK durch den invasiven Eingriff kann bei der GvHR, bei der eine Antigenpräsentation im LK stattfindet, nicht akzeptiert werden. Darüber hinaus kann der Versuchserfolg durch

operativ bedingte Entzündungen und/oder Infektionen beeinträchtigt werden. Die in unseren Versuchen beobachtete Reinnervation des pLK nach 8 Tagen scheint typisch für die lokale chemische Denervierung zu sein, denn dieser Effekt wird auch von Lorton et al. beschrieben (Lorton et al., 1996; Lorton et al., 1999).

Nachdem die minimalinvasive Methode der Denervierung etabliert war, wurde der ganze Lymphknoten für die immunologischen Untersuchungen verwendet. Eine direkte Kontrolle des NA-Gehalts ist in diesen Organen dann unmöglich. Ein weiteres Ziel in der Entwicklung der neuen Technik war es, die Denervierung des pLK im jeweiligen Versuchstier direkt nachzuweisen und nicht in parallel behandelten Ratten, wie es bei Lorton et al. gezeigt ist (Lorton et al., 1996 und 1999). Es wurde versucht, das den pLK umgebene Fettgewebe als Referenzgewebe für die NA-Messung zu verwenden. In einer Versuchsreihe konnten wir zeigen, dass der NA-Gehalt im Fettgewebe deutlich reduziert wird und dass die Abnahme des Neurotransmitters mit der Reduzierung von NA in dem jeweils zugehörigen LK korreliert (Abb.5.1.-7 + -8). Mit dieser Methode ist die direkte Aussagefähigkeit über eine gelungene Denervierung des pLK erheblich größer als mit der Messung parallel durchgeführter Denervierungen in Referenztieren. Mögliche Fehler in der Ausführung können auf diese Weise direkt in jedem Versuchstier erkannt werden.

Ein weiterer Kritikpunkt an früheren Arbeiten ist die gleichzeitige Denervierung des inguinalen LK (ingLK), der weiter entfernt liegenden Milz und des Herzens. Mit unserer Methode wird der Noradrenalingehalt des ingLK und der Milz durch die Injektion von 6-OH-DA in die Kniekehle der Tiere nicht vermindert, wenngleich die NA-Menge im ingLK 3 Tage nach der Behandlung tendenziell erniedrigt scheint. In jedem Fall werden nach 8 Tagen keine Unterschiede in den NA-Konzentration der ingLK der denervierten und der nicht denervierten Körperseite gemessen. Diese Ergebnisse sind umso erstaunlicher, da die von uns applizierte 6-OH-DA Dosis pro Ratte um einiges höher ist gegenüber den

Versuchen von Lorton et al. (Lorton et al., 1996 und 1999). Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz ist, dass durch die Operation zerstörte Blutkapillaren das injizierte 6-OH-DA in das Blut aufnehmen und dieses möglicherweise einen ähnlichen Effekt hat wie intravenös injiziertes 6-OH-DA.

Der pLK ist für die Untersuchung neuro-immunologischer Interaktionen gut geeignet, da die ersten Schritte der Immunantwort weitestgehend regional beschränkt bleiben, wenn im Falle der lokalen GvHR die parentalen Zellen in die Fußsohle appliziert werden. Die Auswirkungen der Denervierung auf die Immunantwort können jedoch nur dann auf die Denervierung des LK bezogen werden, wenn keine anderen Strukturen von der NA-Reduzierung betroffen sind (s.o.). Um zu gewährleisten, dass auch der Ort der Antigenerkennung (die Fußsohle) durch APC normal innerviert ist, wurde der NA-Gehalt im Bindegewebe und der Muskulatur der Fußsohle untersucht. Dabei konnten keine veränderten NA-Werte in den untersuchten Strukturen gemessen werden, wenn im selben Hinterlauf der pLK denerviert worden ist. Damit kann man ausschliessen, dass bereits die Antigenerkennung am Ort der Zellinokkulation unter veränderter, noradrenerger Innervation stattfindet.

Das neue Verfahren zur lokalen Denervierung hat gegenüber der in der Literatur beschriebenen Technik deutliche Vorteile. Der NA-Gehalt im pLK wird ähnlich stark reduziert wie es in anderen Arbeiten beschrieben worden ist. Die Vorteile unserer Methode liegen darin, dass Verletzungen der afferenten Lymph- und Blutgefäße nicht auftreten und dass mögliche operationsbedingte Infektionen und Entzündungen minimiert werden. Nachweislich bleibt die Denervierung lokal begrenzt, so dass der Ort der Antigenerkennung von dem Neurotoxin nicht beeinflusst wird. Die Messung des NA-Gehalts im Fettgewebe erlaubt im Vergleich mit der kontralateralen Seite die Kontrolle des Denervierungserfolges im selben Tier.

Dieses Modell bietet die Möglichkeit, den Einfluss der Innervation auf einen LK

zu untersuchen, der von einem peripher über die Haut in den Körper eingedrungen, immunologisch wirksamen Stimulus aktiviert wird. Untersuchungen zu dem Einfluss der Innervation auf die ersten Schritte eines peripheren Immunstimulus wurden mit der lokal induzierten GvHR durchgeführt. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Versuche mit denen der systemischen GvHR vergleichen zu können.

6.2 Veränderungen in der Milz während systemischer GvHR

Mitte der fünfziger Jahre wurden erstmals tierexperimentelle Untersuchungen der GvH Erkrankung beschrieben (Billingham et al., 1957; Simonsen, 1957 u.a.). Dabei können nur immunologisch kompetente Donor-zellen, die sich in ihrem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) vom Empfänger unterscheiden, in diesem eine GvHR hervorrufen. Eine Vielzahl verschiedener Tiermodelle wurde seither entwickelt, um die verschiedenen Stadien der Erkrankung und die beteiligten Zellen zu untersuchen und zu charakterisieren.

In den hier beschriebenen Experimenten werden normalen, nicht bestrahlten Ratten 1×10^8 von Erythrozyten gereinigte Milzzellen intravenös injiziert und 10 Tage später Milz und Blut entnommen. Die vergleichsweise geringe Dosis Donorzellen führt zur Ausbildung einer spezifischen Immunreaktion, bei der jedoch keine signifikanten Krankheitszeichen wie Gewichtsverlust, Durchfall oder Haarausfall auftreten.

6.2.1. Allgemeine Bestimmungen

Die Ausprägung einer systemischen GvHR kann mit dem Milzindex bewertet werden. Dabei wird für die verschiedenen Versuchsgruppen die relative Änderung des Milzgewichtes zum Körpergewicht berechnet. Neben dem Milzindex ist das absolute Milzgewicht ein wichtiger Parameter zur Darstellung

der Ausprägung der GvHR. Folgende Feststellungen können gemacht werden: die Milzdenervierung *per se* und die Immunstimulation erhöhen jeweils in den Tieren das absolute und relative Milzgewicht. In den Tieren mit denervierter Milz die einer GvHR unterliegen, sind die Werte beider Parameter größer als in den übrigen Versuchsgruppen. Diese Zunahme des Milzgewichts könnte auf der zunehmenden Zahl von Zellen beruhen und einer Akkumulation von Blut aufgrund des reduzierten vasokonstriktorisches Tonus. Dass die Milzgröße nicht ausschließlich durch die NA-Freisetzung reguliert wird, zeigt die Tatsache, dass die Immunstimulierung in den denervierten Milzen zu einer weiteren Größenzunahme dieses Organs führt. Dieses Phänomen wurde bereits bei Untersuchungen des Blutflusses in der Milz nach systemischer LPS und IL-1 β Gabe beschrieben (Rogausch et al., 1995; Rogausch et al., 1997). Andere vasoaktive Substanzen scheinen unter dem Einfluss von IL-1 β wirksam zu sein (Rogausch et al., 1997).

Die Zunahme der Proliferation lymphatischer Zellen in der Milz während einer GvHR ist vielfach gezeigt worden (Fox, 1962; Via, 1991; Rus et al, 1995). In der vorliegenden Arbeit wird ausserdem gezeigt, dass 10 Tage nachdem die GvHR induziert wurde nicht nur die Zahl der Leukozyten zunimmt, sondern auch die Erythrozytenzahl tendenziell ansteigt. Während die Denervierung des Milznerven normaler Tiere auch zu einer leichten Zunahme roter Blutkörperchen führt, wird die Zahl weißer Blutkörperchen in der Milz tendenziell reduziert. Wird eine GvHR in einem Tier mit denervierter Milz hervorgerufen, bleibt die tendenzielle Zunahme der Erythrozytenzahl erhalten, wohingegen die Zahl der Leukozyten signifikant reduziert wird. Daraus resultiert eine signifikante Zunahme des Erythrozyten/Leukozyten Index in diesen Tieren. Die Zunahme der Erythrozyten ist wegen der fehlenden Vasokonstriktion zu erwarten. Eine reduzierte absolute Leukozytenzahl in immunstimulierten Tieren nach lokaler Denervierung der Milz ist in der Literatur so nicht beschrieben. Vielmehr zeigen Versuche, dass nach systemischer Zerstörung der noradrenergen, peripheren Fasern in der Ratte (Besedovsky et al., 1979) und der Maus (Madden et.al,

1994) eine gesteigerte Proliferation von nukleären Zellen in lymphatischen Organen (u.a. LK und Milz) stattfindet. Die Zunahme der Proliferation ist auch nach chirurgischer Denervation der Milz beobachtet worden (Besedovsky et al., 1979).

Die verstärkte Reduzierung lymphatischer Zellen nach allogener Stimulation in denervierten Milzen scheint im Gegensatz dazu zu stehen. Neben dem Einfluss der Proliferation auf die Leukozytenzahl kann auch das Migrationsverhalten der Leukozyten den Erythrozyten/Leukozyten Index beeinflussen. Da bekannt ist, dass beide Parameter, Proliferation und Migration, von NA reguliert werden können (Ernström und Sandberg, 1973; Moore, 1984; Übersicht: Elenkov et al., 2000 und Carlson, 2001), ist zu erwarten, dass nicht nur das Milzgewicht, sondern auch die zelluläre Zusammensetzung der Milz von der Denervierung beeinflusst wird. Es wäre denkbar, dass einer gesteigerten Proliferation eine verstärkte Auswanderung gegenübersteht, so dass in der Bilanz der Milz die Leukozytenzahl reduziert ist.

Die Messungen der NA-Menge in der Milz bestätigen die erfolgreiche Denervierung. Daneben zeigt die Abbildung 5.2-6 aber auch, dass die allogene Stimulation in den scheinoperierten Tieren die NA-Konzentration in der Milz senkt. Bezogen auf die Gesamtmilz ändert sich der Gehalt des Neurotransmitters jedoch nicht. Da neben den Blutgefäßen, den Trabekeln und der Kapsel in der Milz die weiße Pulpa innerviert wird, nicht aber die rote, und nach allogener Stimulation in der denervierten Milz die rote Pulpa stärker zunimmt als die weiße Pulpa, ist die NA-Menge bezogen auf die Zellzahl der direkteste Parameter für die Transmitterdichte in der Mikroumgebung der weißen Blutzellen. Entsprechend dieser Berechnung sind die Leukozyten in der Milz während einer GvHR einer geringeren NA-Dichte ausgesetzt als Milzzellen in einem nicht stimulierten Tier.

Besedovsky et al. und del Rey et al. konnten in der Ratte zeigen, dass nach

Stimulation mit Schaferythrozyten der NA-Gehalt der Milz mit zunehmender Zahl antikörperproduzierender Zellen abnimmt (Besedovsky et al., 1979; del Rey et al., 1981; Rey et al., 1982). Dies ist ein Beispiel für die Beeinflussung des sympathischen Nervensystems durch das Immunsystem. Obwohl der Ansatz der hier diskutierten Arbeit auf die Einflussnahme des Nervensystems auf das Immunsystem fokussiert, wird die Bedeutung der NA-Reduzierung durch einen Immunstimulus in dieser Arbeit diskutiert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die allogene Stimulation das Milzgewicht durch eine Steigerung der Erythrozyten- und Leukozytenzahl erhöht, vermutlich begleitet von einem gestiegenen Plasmavolumen. Die gestiegene Zahl immunkompetenter Zellen ist der Literatur zufolge auf die klonale Expansion aktivierter Lymphozyten zurückzuführen. In den immunstimulierten Tieren ist der Blutzustrom nach Denervierung der Milz zusätzlich gesteigert, da die gefäßverengende Wirkung des NA fehlt. Gleichzeitig wird jedoch die Zahl mononukleärer Zellen im Vergleich zur innervierten Milz in Tieren, die eine GvHR durchmachen, verringert. Dieses Phänomen der Abnahme von Leukozyten würde bedeuten, dass aufgrund der Reduzierung des NA-Gehaltes in der Milz durch die Immunantwort, die Zahl immunkompetenter Zellen in der Milz in immunstimulierten verringert wird. Solange nicht eindeutig geklärt ist welche Subpopulation in der denervierten Milz während einer Immunreaktion vermindert ist, kann in diesem Zusammenhang keine Aussage über die Bedeutung der NA-Reduzierung in der immunstimulierten Milz getroffen werden.

Ob die Zahl der Immunzellen in der Milz durch den gesunkenen NA-Gehalt während einer GvHR reduziert wird, kann mit unseren Methoden nicht nachgewiesen werden. Der indirekte Nachweis, bzw. die Schlussfolgerung aus den Denervierungsversuchen legt diese Vermutung jedoch nahe. Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungen diskutiert, die zeigen dass die Denervierung die zelluläre Zusammensetzung und die Zytokinproduktion beeinflusst.

6.2.2 Zelluläre Zusammensetzung und Zytokinproduktion

Die Graft versus Host Reaktion ist in den vergangenen Jahrzehnten unter den verschiedensten Zielsetzungen intensiv untersucht worden. Der vermutlich bedeutenste Aspekt ist die GvH Erkrankung nach Knochenmark-Transplantation (KMT), bei der die transplantierten, immunkompetenten Zellen (Graft) gegen die Antigene des Empfängers (Host) reagieren. Die Stärke der Ausprägung ist vor allem von der genetischen Diversität zwischen Spender und Empfänger abhängig. Viele tierexperimentelle Untersuchungen werden gemacht, um therapeutische Ansätze zur Bekämpfung der GvHR nach KMT zu entwickeln. Seit den sechziger Jahren wird der Verlauf der GvHR untersucht und einer Arbeit aus dem Jahr 1962 zufolge (Fox et al., 1962), wird die stärkste Zellproliferation 2-3 Tage nach Aufnahme der Zellen in die Milz beobachtet und bleibt in verminderter Stärke 12 Tage bestehen.

Das Migrationsverhalten der Zellen ist in den 70er Jahren intensiv untersucht worden. Die Verteilung der Donorzellen im Empfängertier ist in der frühen Phase der Reaktion vom Ort der Inokulation abhängig, wie Ford et al. (Ford et al., 1970) für die Lokalisierung intracutan injizierter Zellen in dem regional drainierten Lymphknoten gezeigt hat. Nach intravenöser Injektion haben Heslop und Hardy die meisten Donorzellen in der Leber nachgewiesen (Heslop und Hardy, 1971). Bereits 4 Stunden nach intravenöser Injektion sind Donor-B- und T-Zellen neben der Leber in den entsprechenden Gebieten der Milz nachweisbar (Sprent, 1973; Aktins u. Ford, 1975). Die Rezirkulation von T- und B- Donorzellen im Empfängertier konnte Howard zeigen (Howard, 1972) und auch die Studien von Sprent haben die Migration von T-Zellen aus der Milz und die Verteilung in Lymphknoten 24 Stunden nach Injektion gezeigt (Sprent, 1973). B-Lymphozyten verbleiben entsprechend dieser Arbeit zu diesem Zeitpunkt in der Milz.

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten dann mit Hilfe neuerer Techniken

(monoklonale Antikörper, PCR) genauere Angaben über die zelluläre Zusammensetzung und den Zytokingehalt lymphatischer Organe gemacht werden. Demnach beginnt die GvHR mit der Aktivierung CD4⁺ Donorzellen nach alloantigen-Erkennung der Klasse II MHC auf Hostzellen (Harada, 1994; Rus et al., 1995) und einer gesteigerten Zellproliferation und IL-2 Sekretion, die 24 - 48 Stunden nach Injektion am höchsten ist (Via, 1991). Im Zuge der frühen Aktivierung steigt nach 7 Tagen die IL-4 und IL-10 Produktion an (Dontrelepont et al., 1991; Rus et al., 1995), ist die IFN- γ Produktion in CD4⁺ und CD8⁺ Donorzellen erhöht, expandieren CD8⁺ Donorlymphozyten (Rus et al., 1995) und sezernieren aktivierte Host B-Zellen in hohem Maße IgE Antikörper (Dontrelepont et al., 1991; Rus et al., 1995). Acht Tage nach intraperitonealer Zellinjektion ist die Zytotoxizität von Host-Makrophagen gesteigert (Fung und Sabbadini, 1982) und nach iv Gabe ist eine gesteigerte NK-Aktivität gemessen worden (Ghayur et al., 1987a; Ghayur et al., 1987b). Die höchsten Anteile aktivierter CD4⁺ Zellen werden 12 Tage nach Induktion der GvHR im Blut beobachtet (Tittle et al., 1997). Via und Mitarbeiter haben 14 Tage nach Zellinjektion aktivierte Spender-CTL und erhöhte Suppressor-Zellaktivität *in vitro* gemessen (Via et al., 1993). In der späten Phase der GvH Erkrankung kommt es dann zu Autoimmunreaktionen im Empfängertier, bei der CD4⁺ Hostlymphozyten (Chen et al., 1998) und eine gestiegene NK-Aktivität der Donorzellen eine Rolle spielen (Ghayur et al., 1987b).

Zusammenfassend kommt es während der frühen Phase der GvHR zu einer Aktivierung der CD4⁺ Donorzellen. Dabei sind zuerst Th1 und später Th2 Zellen aktiv, die wiederum hauptsächlich Host B-Zellen unspezifisch aktivieren. Daneben sind in der frühen Phase CTL (CD8⁺) Zellen sowie NK-Zellen und Makrophagen aktiv. Die GvHR unterdrückt das Immunsystem des Hosts und die generelle Aktivierung führt in der späten Phase neben Organschädigungen (z.B. Nephritis) häufig zur Letalität.

Unsere Untersuchungen 10 Tage nach Immunisierung bestätigen das

allgemeine Aktivierungsmuster mit stark proliferierenden Zellen und erhöhtem Gehalt an einigen Zytokinen. In der Tabelle 1 sind die Veränderungen in den Milzen scheinoperierter Tiere nach allogener Stimulation zusammen gefasst. Die stärksten, zu diesem Zeitpunkt detektierbaren Veränderungen in einer GvHR sind eine gestiegene CD8⁺ - und NK-Zellzahl. Die Zusammensetzung der Milz zeigt einen signifikant gesunkenen Anteil an B-Zellen und CD4⁺ Lymphozyten und eine starke Zunahme von T-Lymphozyten, die den IL-2 Rezeptor und den Aktivierungsmarker CD134 exprimieren. 10 Tage nach Beginn der GvHR bleibt die Konzentration von IL-1 β und IL-2 unverändert. Demgegenüber sind TNF- α und das Th2 Zytokin IL-10 deutlich erhöht.

6.2.3 Zelluläre Zusammensetzung und Zytokinproduktion in der denervierten Milz

Die Problematik der Milzgröße für die Bedeutung der Zytokindichte und der Transmitterdichte (NA) in der Milz soll an dieser Stelle kurz diskutiert werden. Die NA- und Zytokinergebnisse sind im Kapitel 5.2 bezogen auf die Gesamtmilz, als Konzentrationsangabe oder bezogen auf die Zahl nukleärer Zellen dargestellt. Im folgenden werden grundlegende Überlegungen zu den Aussagemöglichkeiten dieser Darstellungen gegeben.

Im Kapitel 6.2.1 wurden die Ergebnisse zu den Erythrozyten- und Leukozytenzählungen in der Milz diskutiert. Der Index Erythrozyten/Leukozyten zeigt während der GvHR in den denervierten Tieren eine starke Erhöhung gegenüber den nicht denervierten Tieren. Ein hoher Index bedeutet eine Zunahme des relativen Anteils der Erythrozyten gegenüber dem leukozytären Anteil. Da anzunehmen ist, dass eine Zunahme der Erythrozytenzahl gleichbedeutend ist mit einer Akkumulation von Blut, wird auch der Plasmaanteil zur proportionalen Gewichtszunahme der roten Pulpa gegenüber der weißen Pulpa in der Milz beitragen. Zytokine werden von immunkompetenten Zellen der weißen Pulpa sezerniert und wirken hauptsächlich

an lymphatischen Zellen. Ihr Einfluss auf Erythrozyten ist vermutlich nicht gegeben. Bei der Bewertung der Zytokine bezogen auf die Gesamtmilz wird fälschlicherweise der Anteil der Erythrozyten mit einbezogen. Werden hingegen die Zytokine als Konzentrationsangabe der Milz berechnet, ist der primär von Erythrozyten bedingten Gewichtszunahme zum Teil Rechnung getragen. Dennoch fehlt der direkte Bezug zu der weißen Pulpa. Da die weiße Pulpa hauptsächlich aus nukleären Milzzellen besteht, entspricht die Berechnung Zytokine pro 10^6 nukleäre Milzzellen der realen Situation am Besten, zumal die Zytokine parakrine Eigenschaften besitzen.

Ähnliches gilt für Noradrenalin, welches aus den Varikositäten der sympathischen Nervenfaserverendigungen und den Synapsen freigesetzt wird. Entsprechend Saito bildet das retikuläre System Kanäle, in die NA diffundiert und mit stagnierenden Lymphozyten aufeinander trifft (Saito, 1991). Darüber hinaus diffundiert NA aus den perivaskulären Varikositäten durch die Adventitia und erreicht so adrenerge Rezeptoren auf Lymphozyten (Vizi et al., 1995). Diese parakrinen Eigenschaften, bei denen Strecken von bis zu einigen Micrometern überbrückt werden, legen es nahe, dass die Angabe des NA-Gehalts in Bezug auf die Zahl mononukleärer Zellen in der Milz größere physiologische Bedeutung hat.

Viele Untersuchungen über die Einflussmöglichkeiten des noradrenergen Systems auf das Immunsystem sind gemacht worden und erste direkte Hinweise wurden durch den Nachweis von β_2 Adrenorezeptoren (β_2 AR) auf $CD4^+$ Lymphozyten gemacht (Conolly & Greenacre, 1977). In späteren Bindungsstudien sind β_2 AR auf Th1 Lymphozyten nachgewiesen worden, nicht aber auf Th2 Zellen (Sanders et al., 1997; Ramer-Quinn et al., 1997). Auf $CD8^+$ Zellen (Loveland et al., 1981) sind ebenso β_2 AR gezeigt worden wie auf B-Lymphozyten (Krawietz et al., 1982). NK Zellen (Jetschmann et al., 1997) und Makrophagen (Spengler et al., 1990; Henricks et al., 1988) haben auf ihrer Zelloberfläche sowohl α AR wie auch β AR exprimiert. Die β_2 AR Dichte auf den

Zellen ist jedoch unterschiedlich. B-Lymphozyten haben eine höhere Rezeptorzahl als CD8⁺ Zellen, und diese wiederum exprimieren mehr adrenerge Rezeptormoleküle als CD4⁺ Zellen.

Neben diesen Bindungsstudien sind vor allem funktionelle Nachweise adrenerger Einflüsse durch Behandlung mit β 2Agonisten durchgeführt worden (Übersicht: Sanders et al., 2001, Madden, 2001). Im Vergleich dazu sind wenige Studien mit NA reduzierten Tieren gemacht und keine Arbeit konnte gefunden werden, bei der für die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung eine lokal chirurgische Durchtrennung des Milznerven durchgeführt worden ist, oder in der nach *in vivo* Versuchen Zytokine als Protein gemessen wurden.

Syngene Zellinjektion: Einfluss der lokalen Denervierung

Die Injektion der Tiere mit syngeneten Zellen diente als Kontrollversuch für die in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zu den Effekten der Denervierung in Tieren mit einer GvHR. Diese Kontrollen waren notwendig um unspezifische Effekte auf die gemessenen Parameter zu untersuchen, die durch den Injektionsstress und die exogene Gabe der Zellen verursacht werden können. Gleichzeitig diente diese Kontrollgruppe dazu, den Effekt der Denervierung *per se* unter Bedingungen zu untersuchen, bei denen nicht zu erwarten ist, dass eine spezifische Immunantwort stattfindet.

In der Tabelle 2 sind die Veränderungen in der Milz, die bei chirurgischer Durchtrennung des Nerven in Tieren nach syngener Zellinjektion auftraten, schematisch dargestellt. Wie oben bereits beschrieben führt die Denervierung der Milz unter Kontrollbedingungen (syngene Zellinjektion) zu einer schwachen Abnahme der Zahl nukleärer Zellen in der Milz. Da sich in den Kontrolltieren die prozentualen B- und T-Lymphozytenanteile kaum verändern, ist die absolute Zahl dieser Populationen in den denervierten Tieren leicht erniedrigt. Die CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen ändern ihre prozentualen Anteile innerhalb der T-

Zellen nicht, die CD4⁺ Zellen zeigen jedoch in der absoluten Zahl eine signifikante Reduktion. Während die proportionalen Anteile sich kaum verändern, ist die zumeist schwache Abnahme der Zellzahlen auf die Reduzierung der nukleären Zellen zurückzuführen.

Zellen in der Milz normaler Tiere, die unter konventionellen Bedingungen gehalten werden, exprimieren den IL-2 Rezeptor. Neben der Tatsache, dass die Tiere nicht in einer keimfreien Umgebung gehalten werden und dadurch einer permanenten Stimulation des Immunsystems durch Antigene in der Umgebungsluft ausgesetzt sind, darf der mögliche Effekt der Operation nicht vergessen werden.

Während die Denervierung zu einem signifikanten Anstieg der proportionalen Anteile IL-2 Rezeptor (IL-2rez⁺) exprimierender Zellen und NK Zellen in der Milz führt, bleibt die absolute Zahl dieser Zellen gleich. Feldman et al. konnten auf humanen Lymphozyten nach β 2AR Stimulation die Reduzierung von IL-2rez⁺ Zellen nachweisen (Feldman et al., 1987) und Stimulierung des Sympathikus auf ganglionärer Ebene inhibiert die NK-Aktivität (Fecho et al., 1993b). Eine mögliche Erklärung ist, dass NA einen Repressor für die Exprimierung dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche darstellt. Durch die Denervierung entfällt die suppressive Aktivität des NA, weshalb die Rezeptoren auf den Zellen möglicherweise hochreguliert werden. Eine weitere, nicht auszuschließende Erklärung könnte sein, dass in der denervierten Milz entweder mehr IL-2rez⁺ Zellen in der Milz zurückgehalten werden, oder dass mehr IL-2rez⁻ Zellen die Milz verlassen.

Der Anstieg der NK-Zellen unter NA Mangel könnte mit einer verminderten Migration aus der Milz erklärt werden, da ein erhöhter NA-Spiegel im Blut die Zunahme von NK-Zellen im Kreislauf fördert (Schedlowsky et al., 1996). Die proportionalen Anteile und die absolute Zahl aktivierter T-Lymphozyten werden durch den NA Mangel in den Kontrolltieren nicht verändert. Auch die

Zytokinproduktion in der Milz von Tieren denen syngene Zellen injiziert wurden, ist nach Durchtrennung des Nerven nicht verändert. Berechnet man den Zytokingehalt auf 10^6 nukleäre Zellen, steigen IL-2 und IL-10 signifikant an.

Zusammengefasst sind nach Denervierung der Milz in den Ratten mit syngener Zellinjektion bis auf die gestiegenen Anteile IL-2^{rez+} Zellen an der T-Lymphozytenpopulation und der NK Zellen keine Veränderungen sichtbar. Wie zuvor erwähnt, sind die Tiere einerseits einem operativen Eingriff unterzogen werden und andererseits werden die Tiere nicht in keimfreier Umgebung gehalten. Deshalb ist eine basale Immunaktivität in den Tieren zu erwarten, welche unter denervierten Bedingungen durch den NA-Mangel beeinflusst werden kann.

GvH Reaktion: Einfluss der Denervierung

In der Tabelle 3 sind die Veränderungen, die in denervierten Milzen von Tieren nach parentaler Zellinjektion verglichen mit innervierten Milzen von Tieren nach gleicher Zellinjektion beobachtet wurden, schematisch dargestellt. Die prozentualen Anteile der T-Lymphozyten in der Milz ändern sich in den denervierten Tieren gegenüber den scheinoperierten während der GvHR nicht. Ebenso wird die Abnahme der prozentualen B-Zellanteile die während der GvHR beobachtet wird durch die Denervierung des Milznerven nicht beeinflusst. Da jedoch die absolute Zahl nukleärer Zellen nach der Milznervdurchtrennung signifikant reduziert ist, sind die Zellzahlen der B- und T-Lymphozyten in der denervierten Milz signifikant erniedrigt.

Die GvHR führt neben einem tendenziellen Anstieg der prozentualen Anteile der NK Zellen zu einer Zunahme der absoluten Zahl dieser Leukozytenpopulation in der Milz. Während die Denervierung *per se* den Anteil dieser Population in der Milz von Kontrolltieren signifikant erhöht, kommt es in denervierten Milzen zu keiner weiteren Zunahme wenn die Tiere zusätzlich immunstimuliert sind. Da die Stimulierung der sympathischen Aktivität die NK-

Aktivität (Irvin et al., 1988; Irvin et al., 1990; Fecho et al., 1993a) und die prozentualen Anteile in der Milz (Murray et al., 1993) reduziert, ist anzunehmen, dass die denervierungsbedingte Zunahme der prozentualen Anteile einen Anstieg der natürlichen, zytolytischen Aktivität widerspiegelt.

Für eine vorläufige Erklärung dieser Ergebnisse muss bedacht werden, dass eine GvHR die NA-Konzentration in einer normal innervierten Milz reduziert (siehe Ergebnisse). Es ist daher vorstellbar, dass bei diesem Immunstimulus eine zusätzliche Reduzierung des NA-Gehaltes durch die Denervierung nicht in einer weiteren Zunahme der NK Zellzahl resultiert. Mit anderen Worten ist unter physiologischen Bedingungen die regulative Kapazität von NA während der hier verwendeten GvHR bereits maximal erfolgt.

Auch die T-Lymphozyten Subpopulationen, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, werden in immunisierten Tieren nach Milznervdurchtrennung in den prozentualen Anteilen nicht verändert. Durch die Verminderung der Gesamtzahl nukleärer Zellen in der Milz durch die Denervierung ist jedoch die absolute Zellzahl dieser Populationen signifikant reduziert.

Die NA-Konzentration in der Milz hat vor allem auf den Aktivierungszustand der Zellen Einfluss, denn die Anteile IL-2^{rez+} und aktivierter T-Zellen sind in den immunstimulierten Tieren mit denervierter Milz signifikant erhöht. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen verschiedene Arbeiten, dass eine anti-CD3 oder Mitogen induzierte Proliferation von Zellen nach adrenerger Aktivierung *in vitro* reduziert ist (Hadden et al., 1970; Bartik et al., 1993; 1994; Baumann et al., 1994) und dass die Expression von IL-2 Rezeptoren auf T-Lymphozyten herunterreguliert wird (Feldman et al., 1987). In den Tieren mit syngener Zellinjektion führt die NA-Reduzierung nur zu einem signifikantem Anstieg der IL-2 Rezeptorexpression, nicht jedoch zu einer gesteigerten Zahl aktivierter Zellen. Möglicherweise reguliert NA die Expression des IL-2 Rezeptors ohne weitere Signale, wohingegen aktivierte Zellen durch NA nur in

Gegenwart zusätzlicher Moleküle bzw. stimulatorischer Reize beeinflusst werden können. Solche für die Beeinflussung von Immunreaktionen durch das noradrenerge System "essentiellen" Signale könnten im Falle der GvHR z.B. Zytokine sein, deren Produktion durch das Antigen getriggert wird oder kostimulatorische Signale, die durch das CD28 Membranprotein vermittelt werden.

Dass die Denervierung die Anteile aktivierter Zellen nur unter stimulatorischen Bedingungen beeinflusst wird in dem veränderten Zytokinmuster während der GvHR deutlich. Zehn Tage nach Injektion parentaler Zellen in Ratten mit denervierter Milz gibt es einen deutlichen Anstieg von IL-1 β , IL-2 und IL-10. TNF- α ist, bezogen auf die Milz, nicht verändert und IFN- γ steigt durch die Denervierung nur leicht an. Wird der Zytokingehalt auf die in der Milz befindlichen nukleären Zellen bezogen, kommt es bei allen gemessenen Zytokinen zu einem signifikanten Anstieg in den Tieren mit einer GvHR, wenn die Milz denerviert ist. Das bedeutet, dass jede Zelle lokal einer höheren Konzentration der Zytokine ausgesetzt ist als Zellen in Tieren mit intakter Innervation.

Entsprechend der Zuordnung der Zytokine zu den Th-Subtypen werden demnach Th-1 (IL-2) und Th-2 (IL-10) Populationen in Abwesenheit von NA während der GvHR verstärkt aktiviert. Auch die IL-1 β produzierenden Zellen (Makrophagen, APC) erhöhen die Synthese des Zytokins. Interessant ist die Tatsache, dass IL-1 β und IL-2 in der innervierten Milz 10 Tage nach Induzierung der GvHR nicht hochreguliert sind. Da IL-2 (Via et al., 1991) und vermutlich auch IL-1 β zu einem früheren Zeitpunkt der GvHR in normalen Tieren verstärkt produziert werden, wäre es möglich, dass der aktivierte Zustand der IL-2 und IL-1 β produzierenden Zellen durch den NA-Mangel länger bestehen bleibt. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass einmal aktivierte Zellen diesen Zustand über einen längeren Zeitraum beibehalten, wenn der suppressive Effekt von NA fehlt. Interessant ist dabei auch, dass die gestiegene IL-2

Konzentration in der denervierten Milz während der GvHR mit dem erhöhten Anteil IL-2rez⁺ Zellen einhergeht. Auf diese Weise können mehr Zellen den stimulatorischen Effekt von IL-2 nutzen.

Das einige der gemessenen Zytokine durch die Denervierung stärker beeinflusst werden, kann mit unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber NA zusammenhängen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass aktivierte Th-1 und Th-2 Zellen den β 2-Adrenorezeptor unterschiedlich exprimieren und dies möglicherweise einen Mechanismus zur selektiven Zytokinproduktion darstellt (Raimer-Quinn et al., 1997). Da man weiß, dass bestimmte Zytokine co-exprimiert werden, ist es andererseits auch möglich, dass in einer Zelle die Produktion von einem Zytokin bevorzugt beeinflusst wird. Hinzu kommt, dass die Sensitivität gegenüber NA möglicherweise mit dem Zeitpunkt der GvHR im Zusammenhang steht.

Diese Daten zeigen, dass die Denervierung der Milz in Tieren mit syngener Zellinjektion und mit allogener Zellinjektion die prozentuale Verteilung der B- und T-Lymphozyten nicht beeinflusst und dass die Anteile CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unter den T-Lymphozyten nicht verändert werden. Der NA-Gehalt beeinflusst zwar die prozentualen Anteile der Subpopulationen in der Milz nicht, aber die Aktivierung der Zellen in Tieren mit einer GvHR ist sehr stark von der NA-Menge abhängig. Ob die proportionale Zunahme aktivierter Zellen in der denervierten Milz das Resultat der gestiegenen Zytokinproduktion ist, oder ob die Akkumulierung aktivierter Zellen der Grund für die gestiegene Zytokin-konzentration ist muss noch geklärt werden. Denkbar ist auch, dass der NA-Mangel einen positiven feed-back Mechanismus zwischen Zellaktivierung und Zytokinproduktion unterstützt.

6.3 Veränderungen im poplitealen Lymphknoten während lokaler GvHR

Der größte Teil der in dieser Doktorarbeit vorgestellten Ergebnisse beruht auf der Untersuchung der Effekte lokaler Denervierung der Milz auf die zelluläre Zusammensetzung, die zellulären Subtypen und die Zytokinproduktion in der Milz während einer systemischen GvHR.

Ein zweiter Hauptaspekt dieser Arbeit war die Etablierung eines passenden Tiermodells für die Untersuchungen des sympathischen Einflusses auf eine lokale Immunreaktion. Für diesen Ansatz wurden der pLK ausgesucht, weil einerseits die anatomische Lage des pLK eine lokale Denervierung ermöglicht und weil dieser LK andererseits als immunologisches Modell für die Untersuchungen von Immunantworten, die auf lokaler Ebene initiiert werden, Anwendung findet.

Nachdem eine erfolgreiche Vorgehensweise zur selektiven Denervierung des pLK während dieser Arbeit etabliert werden konnte, wurden erste Experimente durchgeführt, in denen Tieren parentale Zellen in die Fußsohle injiziert wurden (lokale GvH Reaktion). Die Ergebnisse der Veränderungen im denervierten pLK während der GvHR sind schematisch in Tabelle 4 dargestellt.

6.3.1 Allgemeine Bestimmungen

Die Messung des Noradrenalingehaltes im poplitealen Fettgewebe zeigt die deutliche Reduzierung des Neurotransmitters in dem denervierten Hinterlauf der Ratte um ca. 70%. Das entspricht den Ergebnissen der Experimente, die zur Etablierung der Methode durchgeführt worden sind (5.1.4). Wegen der Korrelation des NA-Gehaltes im Fettgewebe mit dem der pLK ist die gelungene Denervierung der pLK sehr wahrscheinlich.

Interessanterweise erhöht sich während einer GvHR auf der innervierten Körperseite im poplitealen Fettgewebe der NA-Gehalt gegenüber dem innervierten Fettgewebe, dessen pLK nicht immunstimuliert wurde, signifikant. Extrapoliert man dieses Ergebnis auf den NA-Gehalt im pLK bedeutet dies eine Zunahme der Transmitterkonzentration in dem LK der einer GvHR ausgesetzt ist. Dies scheint im Gegensatz zu der Abnahme der NA-Konzentration in der Milz während einer GvHR in normal innervierten Tieren zu stehen. Es ist daher notwendig darauf hinzuweisen, dass die evaluierten Immunparameter in der lokalen GvHR im pLK wesentlich stärker verändert sind als in der Milz während der systemischen GvHR. Außerdem wurden die Untersuchungen der Effekte der Denervierung auf die lokale GvHR zu einem früheren Zeitpunkt nach Injektion der parentalen Zellen durchgeführt, verglichen mit den Bestimmungen während der systemischen GvHR.

Da die Veränderung des NA-Gehaltes von enormer immunphysiologischer Bedeutung ist, muss dieses Ergebnis durch direkte Messungen der NA-Konzentration im pLK verifiziert werden. Sollten die NA-Konzentrationen im LK auf gleiche Weise verändert sein wie im Fettgewebe, könnte die Bedeutung in einer immunsuppressiven Wirkung liegen, da gezeigt wurde, dass noradrenerge Agonisten die Proliferation von Zellen in Lymphknoten nach Antigenstimulation hemmen (Heilig et al., 1993). Ein solcher Mechanismus könnte dazu beitragen eine überschießende Proliferation während der GvHR zu bremsen.

Das Lymphknotengewicht steigt während der GvHR bis um das Zehnfache der Kontrollorgane an. Die Zunahme entspricht den in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Lymphknotengewichte während einer GvHR im pLK, die in Abhängigkeit der applizierten Dosis Donorzellen und dem Zeitpunkt der Organentnahme linear zunehmen (Ford et al., 1970 Ford et al., 1981). Da die Zunahme der Organgewichtes auch mit der Zunahme der Zellzahl korreliert (Abb.5.3.4), spiegelt die Gewichtsänderung auch die Stärke der

Zellproliferation wieder. In der Darstellung des Regressionsplots ist noch ein anderes Phänomen sichtbar. Die denervierten LK haben während der GvHR bei gleichem Organgewicht wie die innervierten pLK einen höheren zellulären Anteil. Dieser Unterschied ist nicht sehr deutlich, dennoch scheint bei gleichem Organgewicht im denervierten LK der NA-Mangel die Zellzahl im Vergleich zum innervierten LK zu erhöhen.

6.3.2 Zelluläre Zusammensetzung

Die zelluläre Zusammensetzung während der frühen Phase der GvHR in normalen Lymphknoten ist vielfach untersucht worden (Ford et al., 1970; Rolstad et al., 1981; Rolstad et al., 1985). Die Ergebnisse dieser Arbeiten stimmen mit den hier gezeigten Resultaten überein. Obwohl die Reaktion von Donor T-Helfer Zellen induziert wird, expandiert der pLK hauptsächlich wegen der Akkumulation und Proliferation von Hostzellen (Rolstad et al., 1977; Rolstad et al., 1986). Dabei ist vor allem der massive Zuwachs an B-Lymphozyten von 30% auf knapp 60% und die Abnahme der CD4⁺ (Th) Population bei gleichzeitigem Ansteigen der CD8⁺ Lymphozyten zu beobachten (Tabelle 4, Spalte 1). Die Anteile der aktivierten T-Lymphozyten (CD134⁺) steigen um mehr als 250% im allogenen stimulierten LK an und die IL-2rez⁺ Zellen nehmen um 50% zu. Abgesehen von den prozentualen Veränderungen steigt die absolute Zahl der Zellen in den einzelnen Subpopulationen wegen der ausgeprägten Proliferation massiv an. Die zellulären Veränderungen entsprechen dem histopathologischen Aussehen der Gewebe, denn während der GvHR kommt es zur Auflösung der Keimzentren und dem Fehlen follikulärer dendritischer Zellen. Darüber hinaus sind die T- und B-Zellareale, wie sie in normalen LK zu sehen sind, nicht vorhanden (Rolstad et al., 1986).

Die Denervierung der pLK verändert die zelluläre Zusammensetzung in den Kontrolltieren (Tabelle 4: Spalte 2) und in den Tieren nach Injektion parental Zellen (Tabelle 4: Spalte 3) nur marginal. Durch die Denervierung des pLK wird

in den Tieren nach Injektion syngener Zellen nur der Anteil der B-Zellpopulation signifikant erhöht. Die Anteile der anderen Populationen bleiben unverändert (Tabelle 4 Spalte 2). Da die Lymphzytenzahl durch die Denervierung im pLK der Kontrolltiere leicht ansteigt, kommt es mit Ausnahme der CD8⁺ Lymphozyten in allen Populationen des syngenen LK zu einer tendenziellen Zunahme der Zellzahl.

Während in den Tieren mit parentaler Zellinjektion die Denervierung die Anteile CD4⁺ Zellen an der T-Lymphozytenpopulation signifikant reduziert, kommt es zu nur einer leichten Zunahme der CD8⁺ Population. Alle anderen Lymphozytenpopulationen im immunisierten Tier bleiben unverändert (Tabelle 4 Spalte 3). Die absoluten Zellzahlen der jeweiligen Subpopulation werden im denervierten pLK leicht reduziert, da die Gesamtzahl nukleärer Zellen tendenziell abnimmt.

Die meisten der untersuchten Parameter (Gewicht, Zahl mononukleärer Zellen, prozentualer Anteil und absolute Zahl der B- und T-Lymphozyten, CD4⁺ Zellen, IL-2rez⁺ und aktivierte T-Lymphozyten) deuten darauf hin, dass die GvHR im denervierten pLK im Vergleich zu der GvHR im innervierten, kontralateralen pLK vermindert ist. Bei der Interpretation dieser Beobachtungen muss man die Tendenz zum gegenteiligen Effekt der Denervierung *per se* auf die bestimmten Parameter mit einbeziehen. Das wird deutlich am Beispiel der B-Lymphozyten, deren Zahl in den nicht stimulierten Tieren durch die Denervierung anzusteigen scheint. Während der GvHR jedoch nimmt die Zahl dieser Zellen im denervierten pLK tendenziell ab, verglichen mit dem innervierten LK. Das bedeutet, dass während der GvHR im denervierten pLK die B-Zellzahl weniger stark zunimmt als in einem normal innervierten. Anders ausgedrückt ist der "basale" Zustand des denervierten LK verschieden von dem eines innervierten LK. Im gezeigten Beispiel könnten im denervierten LK bereits mehr B-Zellen präsent sein, wenn die parentalen Zellen injiziert werden. Ob dies bedeutet, dass während einer GvHR im denervierten LK proportional weniger B-Zellen proliferieren, weniger im

LK zurückgehalten werden oder weniger Zellen migrieren, bleibt noch zu klären.

Die bisher gemachten Untersuchungen und die begrenzte Zahl der evaluierten Parameter erlauben noch keine abschließende Interpretation immunregulativer Effekte der sympathischen Nerven auf den pLK. Ein Aspekt der auch bedacht werden muss ist, dass die lokale GvHR zu einer stark ausgeprägten Immunantwort führt und dies möglicherweise der Grund dafür ist, weshalb die Denervierung nicht zu signifikant sichtbaren Veränderungen im pLK führt. Eventuell provoziert die Stärke des Immunstimulus eine Reaktion des Immunsystems, die in seiner Ausprägung über die regulative Kapazität des sympathischen System hinaus geht. Die applizierte Dosis von 1×10^7 Zellen liegt weit höher als die Dosis, die z.B. in den Experimenten von Rolstad et al. gegeben wurde (Rolstad et al., 1986). Weitergehende Versuche mit einer niedrigeren Dosis und Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten sollten in zukünftigen Versuchsplanungen bedacht werden. Die Änderungen in der CD4+ Population in den denervierten LK während der GvHR sollten ebenfalls in weiteren Versuchen eingehender untersucht werden, z.B. indem Messungen der Zytokine ähnlich wie in der Milz differenzierte Aussagen über die T-Helfer Subpopulationen zulassen.

Ungeachtet dessen bietet die neue, minimalinvasive Technik zur lokalen Denervierung des pLK hervorragende Möglichkeiten, lokale Mechanismen neuroimmunologischer Interaktionen zu untersuchen. Das hier verwendete immunologische Modell der GvHR ist nur ein Beispiel für die verschiedenen immunologischen Stimuli, die für die Untersuchung derartiger Fragestellungen geeignet sind. Stimulation der T-Zellen mit spezifischen Antigenen (z.B. Superantigene), lokale Infektionen und Entzündungen oder Untersuchungen arthritischer Erkrankungen finden in diesem Modell ausgezeichnete Voraussetzungen.

Die Möglichkeit, dass NA die Mechanismen in der frühen T-Zellstimulation wie Antigenpräsentation und/oder die Expression kostimulatorischer Moleküle

beeinflusst, sollte ebenfalls untersucht werden, denn einige Arbeiten weisen darauf hin, dass beide Mechanismen durch NA beeinflusst werden können. Zum Beispiel moduliert NA die zytokininduzierte Klasse II MHC Molekül Expression (Frohmann et al., 1988; Coutinho et al., 1991) und kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression eines wichtigen kostimulatorischen Moleküls der T-Zellen (B7-2) durch β -adrenerge Agonisten hochreguliert wird (Kasprowicz et al., 2000).

Darüber hinaus müssen die Untersuchungen nicht auf den LK beschränkt bleiben. Die Mechanismen sympathischer Beeinflussung der Antigenerkennung und präsensation stellen weitere spezielle Zielsetzungen dar, bei denen eine lokal begrenzte Reaktion wünschenswert ist. Alternativ kann im Falle der GvHR für solche Untersuchungen auch der Ort der Zelleninokulation denerviert werden.

6.4 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die wichtigsten Zielsetzungen dieser Arbeit waren: 1) ein besseres Wissen über die Einflüsse des sympathischen Nervensystems auf die Modulierung der Immunantwort in der Milz zu bekommen; 2) ein entsprechendes Modell zu etablieren, um dieses Problem in Lymphknoten untersuchen zu können.

Sehr wenige Arbeiten haben in *in vivo* Versuchen diese Thematik bearbeitet. Keine Arbeit ist bekannt, in der neben der prozentualen Verteilung die absolute Zellzahl in der Milz gemessen wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aktivierte Lymphozyten unter adrenerger Stimulation verstärkt lymphatische Organe verlassen (Ernström und Sandberg, 1973; Moore, 1984). Obwohl die Denervierung der Milz vor Induzierung der GvHR die prozentualen Anteile der T- und B-Lymphozyten nicht verändert, führt diese Modulation im Vergleich zu scheinoperierten Tieren, die ebenfalls einer GvHR unterliegen, zu einer Abnahme

mononukleärer Zellen in der Milz. Gleichzeitig resultiert die Denervierung in einer selektiven Zunahme der Anteile aktivierter T-Lymphozyten, wie mit der Messung des IL-2 Rezeptors und dem CD134 Marker sowie der gestiegenen Zytokinproduktion, herausgefunden wurde. Welche funktionelle Bedeutung könnten die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit Immunreaktionen unter physiologischen Bedingungen haben?

Da während Immunreaktionen der NA-Gehalt in der Milz reduziert sein kann (Besedovsky et al., 1979; del Rey et al., 1982), entspricht die Denervierung des Milznerven der Simulation dieses Phänomens. Überträgt man die Ergebnisse aus den Versuchen mit durchtrenntem Milznerv auf die Situation während einer Immunreaktion, kann man folgern, dass während einer Immunantwort aktivierte Zellen in der stimulierten Milz aufgrund der verminderten NA-Konzentration zurückgehalten werden und stärker proliferieren. Möglicherweise wird sogar ihre Aktivität, die sich in der Zytokinproduktion ausdrückt, erhöht. Dabei sind neben den Th-1 und Th-2 Zellen (IL-2 und IL-10) vermutlich auch IL-1 β sezernierende Makrophagen verstärkt aktiv. Bei der letztgenannten Population muss in weiteren Versuchen untersucht werden, in wie weit die Denervierung die Proliferation und/oder Migration verändert.

Die immunphysiologische Relevanz der hier gezeigten Ergebnisse könnte darin bestehen, dass die Abnahme des NA-Gehaltes in der normal innervierten Milz während einer Immunantwort ein verstärktes Zurückhalten aktivierter Zellen in der Milz zur Folge hat. Diese Zellen wären dann dem suppressiven Effekt von NA weniger stark ausgesetzt und könnten sich so besser entwickeln. Gleichzeitig wird die Rezirkulation naiver- oder Gedächtniszellen bevorzugt. Die Chance auf diesem Weg Antigene außerhalb der Milz in der Körperperipherie und anderen sekundären lymphatischen Organen anzutreffen wird dadurch erhöht. Letztendlich führt die reduzierte NA-Menge in der Milz zu einer Verstärkung bestehender Immunreaktionen bei gleichzeitig erhöhter,

allgemeiner Alarmbereitschaft des Körpers.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate und die auf dieser Basis gemachten Interpretationen werfen neue Fragen auf, die zur Verifizierung der zuletzt aufgestellten Hypothese beantwortet werden müssen. In weitergehenden Versuchen könnten Untersuchungen der Antigenerkennung und die Beeinflussung der Antigenpräsentierenden Zellen durch das periphere sympathische Nervensystem näher beleuchtet werden. An diesem Punkt wäre die parallele Anwendung des systemischen und lokalen GvHR Modells oder anderer Antigene in Kombination mit der neuen Technik zur lokalen Denervation des politealen Lymphknotens eine optimale Erweiterung der Versuche.

Um die These der erhöhten Alarmbereitschaft des Körpers während einer GvHR zu verifizieren, wäre ein zweiter, lokal in die Fußsohle applizierter, spezifischer Stimulus ein geeignetes Modell, die Wirkung der Reduzierung des NA-Gehaltes in der Milz während der GvHR zu untersuchen. Die möglicherweise veränderte Migration unter diesen Bedingungen könnte in weiterführenden Experimenten, bei denen neben dem zweitem Stimulus markierte Milzzellen Verwendung finden, studiert werden.

Die Optimierung der lokalen GvHR in Kombination mit der minimalinvasiven lokalen Denervierung und die Messung der Zytokinproduktion in den pLK sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Aber auch unabhängig von den Experimenten mit der GvHR sollte die neue Denervationstechnik in anderen Tiermodellen angewendet werden, die lokalen Mechanismen neuro-immunologischer Interaktionen zu untersuchen. Die experimentell induzierte Arthritis ist in diesem Zusammenhang sicher ein adäquates Modell mit klinischer Relevanz und die lokale Denervierung des pLK und/oder in erweiterter Form auch die Denervierung der Fußsohle können einen Beitrag zur Untersuchung rheumatoider Erkrankungen leisten.

7. Literaturverzeichnis

Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*; 383(6603): 787-93.

Aktins R.C., Ford W.I., 1975. Early cellular events in a systemic graft-vs.-host reaction. I. The migration of responding and nonresponding donor lymphocytes. *J Exp Med*. 141(3): 664-80.

Bartik M. M., Brooks W. H., Roszman T. L. 1993. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the beta-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. *Cell Immunol*; 148(2): 408-21.

Bartik M. M., Bauman G. P., Brooks W. H., Roszman T. L. 1994. Costimulatory signals modulate the antiproliferative effects of agents that elevate cAMP in T cells. *Cell Immunol*; 158(1): 116-30.

Bauman G. P., Bartik M. M., Brooks W. , Roszman, T. L. 1994. Induction of cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity in T cells after stimulation of the prostaglandin E2 or the beta-adrenergic receptors: relationship between PKA activity and inhibition of anti-CD3 monoclonal antibody-induced T cell proliferation. *Cell Immunol*; 158(1): 182-94.

Bellinger D. L., Lorton D., Romano T. D., Olschowka J. A., Felten S. Y., Felten D. L. 1990. Neuropeptide innervation of lymphoid organs. *Ann N Y Acad Sci*; 594: 17-33.

Besedovsky H. O., del Rey A., Sorkin E., Da Prada M., Keller H. H., 1979. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol*. 48, 2:346-55

Besedovsky H., del Rey A., Sorkin E., Da Prada M., Burri R., Honegger C. 1983. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. Science; 221(4610): 564-6.

Besedovsky H.O. and del Rey A., 1996. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. Endocrine Rew. 17, 1:64-102

Besedovsky H. O., del Rey A., Sorkin E., Burri R., Honegger C. G., Schlumpf M., Lichtensteiger W. 1987. T lymphocytes affect the development of sympathetic innervation of mouse spleen. Brain Behav Immun; 1(2): 185-93.

Billingham R.E., Brent L. Medawar P.B., 1957. Ann. N.Y. Acad. Sci. 59:109

Borovikova L. V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G. I., Watkins L. R., Wang H., Abumrad N., Eaton J. W., Tracey K. J. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature ; 405(6785): 458-62.

Carlson S. L., Trauth K., Brooks W. H., Roszman T. L. 1994. Enhancement of beta-adrenergic-induced cAMP accumulation in activated T-cells. J Cell Physiol; 161(1): 39-48.

Carlson S. L. 2001. Neural influences on cell adhesion molecules and lymphocyte trafficking. Psychoneuroimmunology 3rd edition, Vol 1, Chapter 7, Acad. Press N.Y.

Chen F., Maldonado M. A., Madaio M., Eisenberg R. A. 1998. The role of host (endogenous) T cells in chronic graft-versus-host autoimmune disease. J Immunol; 161(11): 5880-5.

Conolly M. E., Greenacre J. K. 1977. The beta-adrenoceptor of the human

lymphocyte and human lung parenchyma. Br J Pharmacol; 59(1): 17-23.

Cook-Mills J. M., Cohen R. L., Perlman R. L., Chambers D. A. 1995. Inhibition of lymphocyte activation by catecholamines: evidence for a non-classical mechanism of catecholamine action. Immunology; 85(4): 544-9.

Coutinho G. C., Durieu-Trautmann O., Strosberg A. D., Couraud P. O. 1991. Catecholamines stimulate the IFN-gamma-induced class II MHC expression on bovine brain capillary endothelial cells. J Immunol; 147(8): 2525-9.

Dailey M.O., Schreurs J, Schulman H., 1988. Hormone receptors on cloned T-lymphocytes. Increased responsiveness to histamine, prostaglandins and β -adrenergic agents as a late stage in T cell activation. J. Immunol 140:2931-2936

del Rey A., Besedovsky H. O., Sorkin E., da Prada M., Arrenbrecht S., 1981. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, II. Cell Immunol. 63(2): 329-34

del Rey A., Besedovsky H. O., Sorkin E., Da Prada M., Bondiolotti G. P. 1982. Sympathetic immunoregulation: difference between high- and low- responder animals. Am J Physiol 1982; 242(1): R30-3.

De Wit D., Van Mechelen, M., Zanin C., Doutrelepont J. M., Velu T., Gerard C., Abramowicz D., Scheerlinck J. P., De Baetselier P., Urbain J., et al., 1993. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. J Immunol; 150(2): 361-6.

Doutrelepont J. M., Moser M., Leo O., Abramowicz D., Vanderhaegen M. L., Urbain J., Goldman M., 1991. Hyper IgE in stimulatory graft-versus-host disease: role of interleukin-4. Clin Exp Immunol; 83(1): 133-6.

Elenkov I. J., Wilder R. L., Chrousos G. P., Vizi E. S. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*; 52(4): 595-638.

Ernstrom U. und Sandberg G., 1973. Effects of adrenergic alpha- and beta-receptor stimulation on the release of lymphocytes and granulocytes from the spleen. *Scand J Haematol*. 11(4): 275-86.

Fecho K., Maslonek K. A., Dykstra L. A., Lysle D. T. 1993a. Alterations of immune status induced by the sympathetic nervous system: immunomodulatory effects of DMPP alone and in combination with morphine. *Brain Behav Immun* ; 7(3): 253-70.

Fecho K., Dykstra L. A., Lysle D. T. 1993b. Evidence for beta adrenergic receptor involvement in the immunomodulatory effects of morphine. *J Pharmacol Exp Ther*; 265(3): 1079-87.

Feldman R. D., Hunninghake G. W, McArdle, W. L. 1987. Beta-adrenergic-receptor-mediated suppression of interleukin 2 receptors in human lymphocytes. *J Immunol*; 139(10): 3355-9.

Felten D.L., Felten, S. Y., Bellinger, D. L., Carlson, S. L., Ackerman, K. D., Madden K., Olschowka J., Livnat, S. 1987. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev*. 100: 225-60

Felten S. & Olschowka J., 1987. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve form synaptic-like contacts o lymphocytes in the splenic white pulp. *J. Neruosci. Res. J Neurosci Res* 1987; 18(1): 37-48.

Finch L., Haeusler G. & Thoenen H., 1973a. A comparison of the effects of chemical sympathectomy by 6-OH-DA in newborn and adult rats. Br. J. Pharmac. 47: 249-260

Finch L., Haeusler G., Kuhn H., Thoenen H. 1973b. Rapid recovery of vascular adrenergic nerves in the rat after chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine. Br. J. Pharmac. 48: 59-72

Fink T., Weihe E., 1988. Multiple neuropeptides in nerves supplying mammalian lymph nodes: messenger candidates for sensory and autonomic neuroimmunomodulation? Neurosci Lett; 90(1-2): 39-44.

Ford W. L., Burr W., Simonsen, M., 1970. A lymph node weight assay for the graft-versus-host activity of rat lymphoid cells. Transplantation. 10(3): 258-66.

Ford W. L., 1978. The measurement of graft-versus-host activity. In Weir, D.M.: Handbook of Experimental immunology, 3rd edition, Vol.2, chapter 30, Blackwell Scientific Publications, Oxford

Ford W. L., Rolstad B., Fossum S., Hunt S. V., Smith M. E., Sparshott S. M. 1981. The stimulus to host cell proliferation in graft-versus-host reactions. Scand J Immunol; 14(6): 705-13.

Fox M., 1962. Cytological estimation of proliferating donor cells during graft-versus-host disease in F1 hybrid mice injected with parental spleen cells Immunology, 5, 489

Frohman E. M., Vayuvegula B., Gupta S., van den Noort S. 1988. Norepinephrine inhibits gamma-interferon-induced major histocompatibility class II (Ia) antigen expression on cultured astrocytes via beta-2-adrenergic

signal transduction mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A; 85(4): 1292-6.

Fung K. Y., Sabbadini E. 1976. Cytotoxicity in graft-versus-host reaction. II. Lysis of target cells of parental genotype by F1 hybrid macrophages. Transplantation; 22(5): 449-54.

Genaro A.M. und Borda E., 1989. Alloimmunization-induced changes in β -adrenoceptor expression and cAMP on B-lymphocytes. Immunophar. 18:63-70

Ghayur T., Seemayer T. A., Kongshavn P. A., Gartner J. G., Lapp W. S. 1987a. Graft-versus-host reactions in the beige mouse. An investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. Transplantation 1987; 44(2): 261-7.

Ghayur T., Seemayer T. A., Lapp W. S. 1987b. Kinetics of natural killer cell cytotoxicity during the graft-versus-host reaction. Relationship between natural killer cell activity, T and B cell activity, and development of histopathological alterations. Transplantation; 44(2): 254-60.

Gowans J.L., Knight E.J. 1964. The role of re-circulation of lymphocytes in the rat. Proc. Roy. Soc. Lond. 159: 257-282.

Grebe S. C., Streilein J. W. 1976a. Graft-versus-Host reactions: a review. Adv Immunol; 22: 119-221.

Grebe S. C., Streilein J. W. 1976b. Disseminated systemic expression of the "local" popliteal lymph node assay in rats. Transplantation; 22(3): 245-55.

Hadden J. W., Hadden E. M., Middleton E. 1970. Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. Cell Immunol; 1(6): 583-95.

Hansen M. K., Nguyen K. T., Goehler L. E., Gaykema R. P., Fleshner M., Maier S. F., Watkins L. 2000. Effects of vagotomy on lipopolysaccharide-induced brain interleukin-1 β protein in rats. *Auton Neurosci* 85(1-3): 119-26.

Harada T, 1994. Graft-versus-host reaction and GvH disease. *Tohoku J Exp Med* 173(1): 171-81.

Heilig M., Irwin M., Grewal I., Sercarz E. 1993. Sympathetic regulation of T-helper cell function. *Brain Behav Immun*; 7(2): 154-63.

Henricks P. A., Van Esch B., Van Oosterhout A. J., Nijkamp F. P. 1988. Specific and non-specific effects of beta-adrenoceptor agonists on guinea pig alveolar macrophage function. *Eur J Pharmacol*; 152(3): 321-30.

Heslop B. F., Hardy B. E. 1971. The distribution of ⁵¹Cr-labeled syngeneic and allogeneic lymph node cells in the rat. *Transplantation*; 11(2): 128-34.

Howard J.C., 1972. The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thoracic duct. *J Exp Med* 135(2): 185-99.

Irwin M., Hauger R. L., Brown M., Britton K. T. 1988. CRF activates autonomic nervous system and reduces natural killer cytotoxicity. *Am J Physiol*; 255(5 Pt 2): R744-7.

Irwin M., Hauger R. L., Jones L., Provencio M., Britton K. T. 1990. Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*; 255(1): 101-7.

Jetschmann J. U., Benschop R. J., Jacobs R., Kemper A., Oberbeck R., Schmidt R. E., Schedlowski M. 1997. Expression and in-vivo modulation of

alpha- and beta-adrenoceptors on human natural killer (CD16+) cells. J Neuroimmunol; 74(1-2): 159-64.

Kasprowicz D. J., Kohm A. P., Berton M. T., Chruscinski A. J., Sharpe A., Sanders V. M. 2000. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. J Immunol; 165(2): 680-90.

Krawietz W., Werdan K., Schober M., Erdmann E., Rindfleisch G. E., Hannig K. 1982. Different numbers of beta-receptors in human lymphocyte subpopulations. Biochem Pharmacol; 31(1): 133-6.

Lapp W. S., Ghayur T., Mendes M., Seddik M., Seemayer T. A. 1985. The functional and histological basis for graft-versus-host-induced immunosuppression. Immunol Rev; 88: 107-33.

Levite M. 1998. Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A ; 95(21): 12544-9.

Lorton D., Hewitt D., Bellinger D. L., Felten S. Y., Felten D. L., 1990. Noradrenergic reinnervation of the rat spleen following chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine: Pattern and time course of reinnervation. Br. Beh. Immun. 4: 198-222

Lorton D., Bellinger D., Duclos M., Felten S. Y., Felten D. L., 1996. Application of 6-hydroxydopamine into the fatpads surrounding the draining lymph nodes exacerbates adjuvant-induced arthritis. J Neuroimmunol. 64(2): 103-13

Lorton D., Lubahn C., Klein N., Schaller J., Bellinger D.L., 1999. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-

induced arthritis. Br. Beh. Immun. 13: 315-334

Loveland B. E., Jarrott B., McKenzie I. F. 1981. The detection of beta-adrenoceptors on murine lymphocytes. Int J Immunopharmacol; 3(1): 45-55.

Madden K. S., Ackerman K. D., Livnat S., Felten S. Y., Felten D. L. 1993. Neonatal sympathetic denervation alters development of natural killer (NK) cell activity in F344 rats. Brain Behav Immun; 7(4): 344-51.

Madden K. S., Felten S. Y., Felten D. L., Hardy C. A., Livnat S., 1994. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration in vivo by chemical sympathectomy. J Neuroimmunol 49(1-2): 67-75

Madden K. S., Felten S. Y., Felten D. L., Bellinger D. L. 1995. Sympathetic nervous system--immune system interactions in young and old Fischer 344 rats. Ann N Y Acad Sci; 771: 523-34.

Madden K.S. 2001. Chatecholamines, sympathetic nerves, and immunity. Psychoneuroimmunology 3rd edition, Vol 1, Chapter 5, Acad. Press N.Y.

McGillis J.P., Organist, M.L. & Payan, D.G., 1987. Substance P and immunoregulation. Fed. Proc. 46: 196-199

Mills P. J., Goebel M., Rehman J., Irwin M. R., Maisel A. S. 2000. Leukocyte adhesion molecule expression and T cell naive/memory status following isoproterenol infusion. J Neuroimmunol; 102(2): 137-44.

Moore T.C. 1984. Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. Immunology 52: 511-528

Murray D. R., Polizzi S. M., Harris T., Wilson N., Michel M. C., Maisel A. S. 1993. Prolonged isoproterenol treatment alters immunoregulatory cell traffic and function in the rat. *Brain Behav Immun*; 7(1): 47-62.

O'Dorisio M.S., Wood, C.L. & O'Dorisio, T.M., 1985. Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide modulation of the immune response. *J. Immunol.* 135: 792s-796s.

Pabst R. 1988. The spleen in lymphocyte migration. *Immunol Today* 9(2): 43-5.

Ramer-Quinn D. S., Baker R. A., Sanders, V. M. 1997. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol*; 159(10): 4857-67.

Ramer-Quinn D. S., Swanson M. A., Sanders V. M. 2000. Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *Brain Behav Immun*; 14(4): 239-55.

Riegele L., 1923. Über die mikroskopische Innervation der Milz. *Zeitsch. für Zellforsch. mikr. Anat.* 9: 511-523

Reilly F. D., 1985. Innervation and vascular pharmacodynamics of the mammalian spleen. *Experientia* ; 41(2): 187-92.

Rogausch H., Del Rey A., Kabiersch A., Besedovsky H.O., 1995. Interleukin-1 increases splenic blood flow by affecting the sympathetic vasoconstrictor tonus. *Am J Physiol.* 268(4).2:R902-8

Rogausch H., del Rey A., Kabiersch A., Reschke W., Ortel J., Besedovsky H.O,

1997. Endotoxin impedes vasoconstriction in the spleen: role of endogenous interleukin-1 and sympathetic innervation *Am J Physiol.* 272(6):R2048-54

Rogausch H., del Rey A., Oertel J., Besedovsky H.O., 1999. Norepinephrine stimulates lymphoid cell mobilisation from perfused rat spleen via β -adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.* 276(45):R724-730

Rolstad B., Fossum S.; 1977. The host component of the popliteal lymph node graft-versus-host (GVH) reaction. Identification of cells in the node and kinetics of cell proliferation. *Tissue Antigens*; 9(2): 96-104.

Rolstad B.; 1985. The popliteal lymph node graft-versus-host (GvH) reaction in the rat: a useful model for studying cell interactions in the immune response? *Immunol Rev* ; 88(5): 153-68.

Rolstad B., Fossum S., Hunt S. V., Ford W. L. 1986.; The host component of the popliteal lymph node graft-versus-host reaction. Selective representation of lymphocyte subsets and the requirement for alloantigenic incompatibility between donor cells and activated host B cells. *Scand J Immunol*; 23(5): 589-98.

Rus V., Svetic A., Nguyen P., Gause W. C., Via C. S., 1995. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8⁺ T cells. *J Immunol* 155(5): 2396-406.

Saito H. 1991. [The relationship between the sympathetic nerves and immunocytes in the spleen]. *Kaibogaku Zasshi*; 66(1): 8-19.

Sanders V. M., Baker R. , Ramer-Quinn D. S., Kasprovicz D. J., Fuchs B. A. Street N. E.; 1997. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by

Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. J Immunol; 158(9): 4200-10.

Sanders V. M., Kasprowicz D.J., Kohm A.P., Swanson M. A. 2001. Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. Psychoneuroimmunology 3rd edition, Vol 1, Chapter 4, Acad. Press N.Y.

Schedlowski M., Hosch W., Oberbeck R., Benschop R. J., Jacobs R., Raab H. R., Schmidt R. E. 1996. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. J Immunol; 156(1): 93-9.

Schneider H., Pitossi F., Balschun D., Wagner A., del Rey A., Besedovsky H. O. 1998. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(13): 7778-83.

Simonsen M., 1957. Acta pathol. Microbiol. Scan. 40: 480

Spengler R. N., Allen R. M., Remick D. G., Strieter R. M., Kunkel S. L. 1990. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. J Immunol; 145(5): 1430-4.

Sprent J., 1973. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. Cell Immunol. 7(1): 10-39.

Thoenen H., Tranzer J. P. 1968. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol; 261(3): 271-88.

Tittle T. V., Weinberg A. D., Steinkeler C. N., Maziarz R. T. 1997. Expression of the T-cell activation antigen, OX-40, identifies alloreactive T cells in acute

graft-versus-host disease. Blood; 89(12): 4652-8.

Via C. S., 1991. Kinetics of T cell activation in acute and chronic forms of murine graft-versus-host disease. J Immunol 146(8): 2603-9.

Via C. S., Finkelman F. D., 1993. Critical role of interleukin-2 in the development of acute graft-versus-host disease. Int Immunol 5(6): 565-72.

Vizi E. S., Orso E., Osipenko O. N., Hasko G., Elenkov I. 1995. J. Neurochemical, electrophysiological and immunocytochemical evidence for a noradrenergic link between the sympathetic nervous system and thymocytes. Neuroscience; 68(4): 1263-76.

Weihe E., Nohr D., Michel S., Muller S., Zentel H. J., Fink T., Krekel J., 1991 Molecular anatomy of the neuro-immune connection. Int J Neurosci; 59(1-3): 1-23.

Westermann J., Pabst R., 1996. How organ-specific is the migration of 'naive' and 'memory' T cells? Immunol Today 17(6): 278-82

Westermann J., Bode U., Pabst R., 1998. Migration of naive and memory T cells in vivo. Immunol Today 19(3):143-4.

William J.M., Peterson R.G., Shea P.A., Schmedtje J.F., Bauer D.C. & Felten D.L., 1981. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: Evidence for a functional link between the nervous and immune systems. Brain Res. Bull. 6: 83-94.

Yang Y. G., Dey B. R., Sergio J. J., Pearson D. A., Sykes M. 1998. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. J Clin Invest 1998; 102(12): 2126-35.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

ACT	Ammonchlorid-Tris-Puffer
AL	Arbeitslösung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AR	Adrenorezeptor
CD	cluster of differentiation
cFP	Bindegewebe der Fußsohle
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
EAE	Experimentelle-Autoimmun-Encephalitis
EAN	Experimentelle-Autoimmun-Neuritis
ELISA	Enzymgekoppelter Antikörper-vermittelter Nachweis von Antigenen
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FCS	foetales Kälberserum
fg	Femtogramm
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	relative Erdbeschleunigung
GvHR	Graft versus Host Reaktion
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ingLK	inguinaler Lymphknoten
LEW	Lewis-Ratten
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysacharid

mFP	Muskelgewebe der Fußsohle
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
NA	Norarenalin
ng	Nanogramm
NGFR	Nerve-Growth-Faktor-Rezeptor
NK	Natürliche Killerzelle
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pFett	popliteales Fettgewebe
pg	Picogramm
pLK	poplitealer Lymphknoten
RIA	Radio-Immuno-Assay
<i>RPE</i>	<i>R</i> -Phycoerythrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Kulturmedium
s.c.	subcutan
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
WKY	Wistar-Kyoto-Ratten
WST	Wistar-Albino-Ratten

8.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Detlev Zwingmann-Cornelius
Geboren am 28.10.1965 in Hannover
Verheiratet, 3 Kinder
Deutsch

SCHULBILDUNG, ZIVILDIENTST UND WEITERBILDUNG

mit Abschluss Abitur am	09/1971 - 05/1984
Matthias-Claudius-Gymnasium Gehrden	
Zivildienst bei der Johanniter-Unfallhilfe	10/1984 - 06/1986
Ausbildung zum Rettungssanitäter	
Studium der italienischen Sprache an der	01/1987 - 10/1987
Universita Italiana Per Stranieri in Perugia, Italien	

BERUFSAUSBILDUNG

Ausbildung zum med.-techn. Laborassistenten	10/1987 - 09/1989
Landeslehranstalt f. medizinisch	
technische Assistenten in Berlin	

ARBEITSVERHÄLTNISSE

MTLA im Klinischen Labor der FU Berlin	03/1990 - 10/1990
MTLA im Diakonie Krankenhaus Marburg	04/1991 - 08/1994
Dozent für Physiologie an der Schule für	09/1996 - 10/2000
Physiotherapie des Klinikums Marburg	

STUDIUM

Studium der Humanbiologie, Marburg	10/1990 - 04/1996
Diplom-Hauptprüfung	05/1995
Diplomarbeit am Institut für	06/1995 - 04/1996
Normale und Pathologische Physiologie,	
AG Neuroendokrinologie, Leiter: Prof. Dr. K. Voigt	
Thema: "Der Einfluss osmotischer und	
thermischer Reize auf neurosekretorische	
Zellen des Hypothalamus"	04/1996
Gesamtnote: sehr gut	
Promotion am Institut für	02/1997 - 06/2001
Normale und Pathologische Physiologie	
AG Immunphysiologie, Leiter: Prof. H.O. Besedovsky	
Thema: "Einflüsse der noradrenergen Innervation	
auf die zelluläre Zusammensetzung, Zellaktivierung und	
Zytokinfreisetzung in lymphatischen Organen während	
einer spezifischen Immunantwort"	

8.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Dame und die Herren:

Prof. Dr. Aumüller

Prof. Dr. Besedovsky

Prof. Dr. Fischer

Prof. Dr. Frenking

Prof. Dr. Garten

Prof. Dr. Golenhofen

Prof. Dr. Grzeschik

Prof. Dr. Habermehl

Prof. Dr. Kaffarnik

Prof. Dr. Kern

Prof. Dr. Kirchner

Prof. Dr. Kleine

Prof. Dr. Lang

Prof. Dr. von Löw

Prof. Dr. Manherz

Prof. Dr. Petzoldt

Dr. Prinz

Dr. del Rey

PD Dr. Rogausch

Prof. Dr. Schachtschabel

Dr. Schulz

Prof. Dr. Voigt

Prof. Dr. Wesemann

und weitere Professoren des Fachbereichs Humanmedizin und anderer
Fachbereiche der Philipps-Universität Marburg

8.4 Publikationen

Originalarbeiten

Dewald M., Braun H.A., Huber M., Zwingmann D., Roth J., Voigt K.H., 2001, Interactions of temperature and angiotensin II in paraventricular neurons of rats in vitro. Pflügers Archiv, (Zur Publikation eingereicht)

Abstracts und Kongressbeiträge

H. Rogausch, D. Zwingmann, A. Kabiersch, H.O. Besedovsky, A. del Rey, (1999) Immune-Noradrenergic Nerve Interactions in the Spleen; The 4th International Congress of the International Society for Neuroimmunomodulation

Dewald M, Braun HA, Hoffmann D, Müller G, Zwingmann D, Hirsch MC, Voigt K (1995). Effects of Interleukin -1 β and the putative febrile mediator PGE2 on rhythmic impulse patterns of magnocellular neuroendocrine neurons in vitro. Proceedings of the 23rd Göttingen Neurobiology. (Eds.) N. Elsner, R.Menzel. Thieme Verlag, Stuttgart NewYork Vol.II: 861.

Dewald M, Braun HA, Hoffmann D, Müller G, Zwingmann D, Hirsch MC, Voigt K (1995). Effects of Interleukin-1 and Prostaglandin E2 on the impulse patterns of magnocellular neuroendocrine neurons of rat brain slices. Pflügers Arch (Suppl) 429(6): R34.

Dewald M, Braun HA, Zwingmann D, Hirsch MC, Voigt K (1995). Effects of Interleukin-1 β and the putative febrile mediator PGE2 on impulse patterns of supraoptic and paraventricular neurons in vitro. Abstracts of the 25RD Annual Meeting of the Society for Neuroscience: 45.8.

Dewald M, Braun HA, Zwingmann D, Voigt K (1996). Effect of angiotensin II on the temperature sensitivity of neurosecretory neurons of hypothalamus slices. *Endocrinology & Diabetes* 104 (suppl.1): p139.

Dewald M, Braun HA, Zwingmann D, Voigt K (1997). Effects and interactions of temperature, hyperosmotic stimuli and angiotensin II on neuronal activity in the paraventricular and supraoptic nucleus of rats in vitro. *Pflügers Arch* (Suppl) 43(6): R70.

Dewald M, Braun HA, Zwingmann D, Voigt K (1997). Angiotensin II modulates neuronal activity and temperature sensitivity in paraventricular and supraoptic neurons in vitro. 7th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club, D3.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel :

"Einflüsse der noradrenergen Innervation auf die zelluläre Zusammensetzung, Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung in lymphatischen Organen während einer spezifischen Immunantwort",

im Institut für Normale und Pathologische Physiologie, Abt. Immunphysiologie, unter Leitung von Prof. Dr. Hugo O. Besedovsky, betreut durch Dr. Adriana del Rey und PD Dr. Heiner Rogausch, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 29.06.2001

8.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. O. Besedovsky danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Normale und Pathologische Physiologie der Philipps-Universität Marburg in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. del Rey, die mich ausgesprochen gut betreuet hat und mir mit Ihrer Erfahrung und Ihrem Wissen jederzeit zur Seite stand. Planung und praktische Umsetzung wissenschaftlichen Arbeitens habe ich bei Ihr lernen können und vieles mehr.

Herrn PD Dr. H. Rogausch danke ich besonders für die vielen hilfreichen Gesten und für die co-Betreuung meiner Arbeit. Ich bedaure sehr, dass der Umfang dieser Arbeit es nicht zuließ, den geplanten zweiten Teil in seinem Labor durchzuführen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei all meinen Kollegen im Labor für die sehr gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt Frau Dr. A. Kabirsch für die HPLC-Messungen und für ihre kurzfristige Bereitschaft, das Manuskript zu korregieren. Frau Bakosh und Frau Muth danke ich für die Bestimmung des Noradrenalins und des Kortikosterons. Die neuen Methoden zu erlernen und das Laborleben mit nützlichen Tricks zu erleichtern wäre mir nicht ohne die Hilfe von Frau Petzoldt gelungen, und so manches Experiment wäre nur halb so gut gelaufen, wenn sie mich nicht unterstützt hätte.

Ganz besonders lieber Dank gilt meiner Familie. Miriam, Tamina, Lina und Lorenzo haben mich in meiner Arbeit immer unterstützt und ermutigt und haben bis zuletzt meine häufige Abwesenheit geduldet, obwohl ich zeitweilig überhaupt nicht ansprechbar war. Vielen Dank!!!

Diese Arbeit wurde von der DFG, SFB 297, und der VW-Stiftung gefördert.